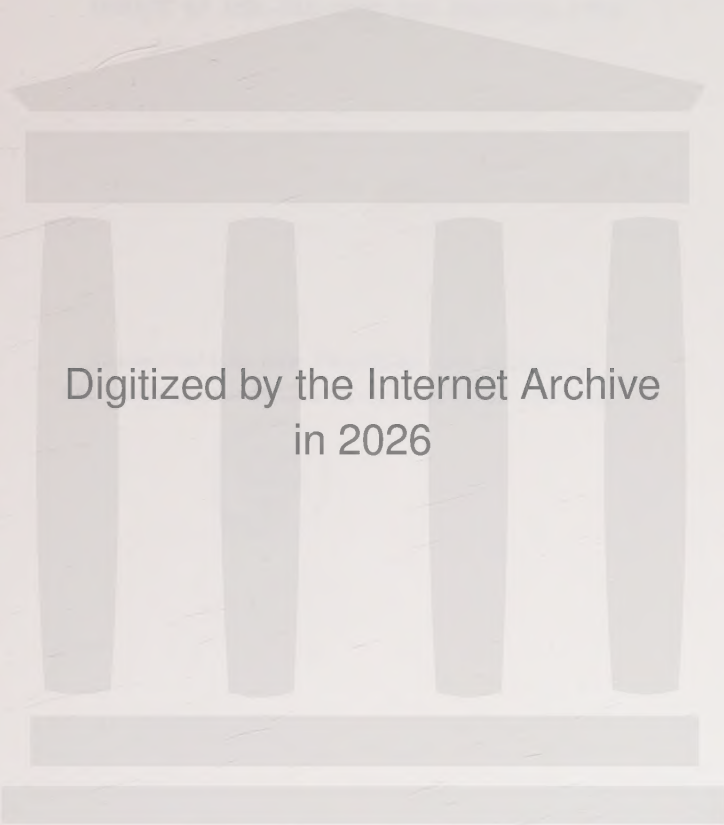


**UNTERSUCHUNGEN AN PROTEINEN,
DIE IN RIBONUKLEOPROTEINPARTIKELN
DES ZELLKERNS TIERISCHER ORGANE
AN DNS-ÄHNLICHE RNS GEBUNDEN SIND**

Dirk Schmidt

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0104

UNTERSUCHUNGEN AN PROTEINEN,
DIE IN RIBONUKLEOPROTEINPARTIKELN DES ZELLKERNS TIERISCHER
ORGANE AN DNS-ÄHNLICHE RNS GEBUNDEN SIND

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Dirk Schmidt
aus
Ellwangen (Jagst)
München, 15. Mai 1974



1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hansjochem Autrum
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfhart Rüdiger
- Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juli 1974

My dear mother, I am writing you
this letter in the hope that you
will find it of some interest. I
am writing you because I have been
thinking of you very much lately.

I am writing you because I have been
thinking of you very much lately.
I am writing you because I have been
thinking of you very much lately.

I am writing you because I have been
thinking of you very much lately.
I am writing you because I have been
thinking of you very much lately.

Meiner Mutter

I am writing you because I have been
thinking of you very much lately.
I am writing you because I have been
thinking of you very much lately.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Hannig in der Zeit vom Februar 1970 bis Juni 1973 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Kurt Hannig

möchte ich für sein Wohlwollen und die großzügige Förderung dieser Arbeit herzlich danken.

Für die ausgezeichnete Anleitung, die anregende Diskussion und stete Unterstützung bedanke ich mich bei

Herrn Dr. Anton Schweiger.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jochen Autrum

danke ich für sein Entgegenkommen, diese Arbeit außerhalb seines Instituts am Max-Planck-Institut für Biochemie durchführen zu können.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
EINLEITUNG	1
1) Genexpression: Transkription und Translation	1
2) Transkription und Translation bei Eukaryonten	2
3) Morphologie und mögliche Funktion der dRNP- Partikel (30 S-dRNP-Partikel)	4
AUFGABENSTELLUNG	8
ERGEBNISSE	9
I. Auswahl des Untersuchungsmaterials	9
II. Versuche zur Isolierung der dRNP-Partikel aus Zellkernen	9
1) Isolierung von Zellkernen	9
2) Extraktion der Zellkerne	12
3) Reinigung der dRNP-Partikel im Dichte- gradienten	13
4) dRNP-Partikel aus Kernen anderer Gewebe und Spezies	17
5) Vorläufige Unterteilung der Proteine der 30 S-Partikel nach ihrem diskelektro- phoretischen Verhalten	19
III. Dissoziation der dRNP-Partikel mit Hilfe von 5 M Harnstoff und präparative Trennung der Komponenten durch trägerfreie Ablenkungs- elektrophorese	21
1) Proteine aus Rattenleberkernen	21
2) a) Bestimmung der Verteilung von Protein und schnellmarkierbarer RNS (dRNS) in Fraktionen nach der träger- freien Elektrophorese	24
b) Analytische Trennung von Protein in Fraktionen nach der trägerfreien Elektrophorese	25
3) Proteine der Partikel aus Kernen anderer Gewebe und Spezies	27

IV.	Charakterisierung des durch trägerfreie Elektrophorese abgetrennten "Haupt-proteins" der 30 S-Partikel	29
1)	Hauptprotein der 30 S-Partikel aus Rattenleberzellkernen	29
a)	Prüfung der Homogenität durch Polyacrylamid - Diskelektrophorese	29
b)	Bestimmung des Molekulargewichts durch Diskelektrophorese unter Verwendung von Natriumdodecylsulfat	31
c)	Bestimmung des isoelektrischen Punkts durch isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgelen	34
d)	Bestimmung der N-terminalen Aminosäure	37
e)	Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung	40
2)	Hauptprotein der Partikel aus Kernen anderer Gewebe und Spezies	40
V.	Hochmolekulare Proteinkomponenten der dRNP-Partikel aus Rattenleberkernen (Komponenten in Abschnitt I der SDS-Diskelektrophorese) und Hinweise für ihre artifizielle Entstehung	46
VI.	Dissoziation der dRNP-Partikel mit 0,4 M KCl und Trennung der Komponenten durch Dichtegradientenzentrifugation	51
1)	Isolierung und Charakterisierung eines löslichen niedermolekularen Proteins	51
a)	Nachweis der in vitro-Affinität des Proteins zu RNS	54
b)	Molekulargewicht und Aminosäurezusammensetzung des RNS-Bindungs-proteins	56
2)	Isolierung eines DNAase-empfindlichen Nukleoproteins	58

DISKUSSION	62
MATERIAL UND METHODEN	76
1) Tierisches Material	76
2) Präparation von Zellkernen aus Rattenleber, Rattenniere, Maus- und Meerschweinchenleber	77
3) Präparation von 30 S-dRNP-Partikeln aus Kernen der Rattenleber bzw. Rattenniere, Maus- und Meerschweinchenleber	80
a) Extraktion der Zellkerne	80
b) Hochtourige Zentrifugation des Kern- extrakts	81
c) Dichtegradientenzentrifugation	81
d) Konzentrierung der 30 S-Partikel aus Fraktionen des Dichtegradienten	83
4) Präparative Trennung von RNS und Protein der 30 S-Partikel durch trägerfreie Elektro- phorese	84
5) Behandlung der dRNP-Partikel mit 0,4 M KCl und Trennung des KCl-Extrakts durch Dichte- gradientenzentrifugation	85
6) In vivo-Markierung der dRNP-Partikel mit ¹⁴ C-Orotsäure	86
7) In vitro Bindung von RNS an isolierte Proteine der 30 S-Partikel	87
8) DNAase-Behandlung des KCl-Extrakts	88
9) Analytische Diskelektrophorese bei pH 4,5	89
10) Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Histon	90
11) SDS-Diskelektrophorese zur Reinheits- kontrolle und zur Bestimmung von Molekular- gewichten	91
12) Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgel	93
13) Aminosäureanalyse	95

14) Bestimmung der N-terminalen Aminosäure	96
15) a) Proteinbestimmung	97
b) RNS-Bestimmung durch Messung der Extinktion bei 260 nm	98
c) DNS-Bestimmung	99
16) Elektronenmikroskopie	101
 ZUSAMMENFASSUNG	 102
 LITERATURVERZEICHNIS	 104

Abkürzungen häufig verwendeter Bezeichnungen

dRNS	DNS-ähnliche RNS
mRNS	messenger RNS
rNRP	Ribonukleoprotein mit DNS-ähnlicher RNS
Informosomen	RNP-Partikel nichtribosomalen Ursprungs
30 S-Partikel	dRNP-Partikel-Monomere aus Zellkernen
UpM	Umdrehungen pro min
Ext.235	Extinktion bei 235 nm
Imp/min	radioaktive Zerfallsrate
ng	Molekulargewicht
VAP	Trägerfreie Elektrophorese nach Hannig
UV	ultraviolett
Tris	Tris (-Hydroxymethyl)-aminomethan
STM	0,14 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM MgCl ₂
SDS	Natriumdodecylsulfat
PAA	Polyacrylamid
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
EDTA	Äthylendiamintetraacetat - Natriumsalz
DTE	Dithioerythrit
TCE	Trichloressigsäure
PFS	Perchlorsäure
G	Gipfel

EINLEITUNG

1) Genexpression: Transkription und Translation

Die Prozesse, die zur Ausbildung eines Merkmals (Genexpression) führen, konnten in ihren wesentlichen Zügen in den letzten zwei Jahrzehnten an Mikroorganismen (Bakterien, Pilzen, Viren) aufgeklärt werden.

Danach ist die Information für die Merkmalsausbildung in Form einer spezifischen Basenfolge in der DNS gespeichert, von der jeweils nach semikonservativer Replikation eine identische Vollkopie an die Tochterzellen weitergegeben wird. Gewöhnlich wird nur der Teil der Information verwirklicht, der zur Erhaltung der Zelle unter gegebenen Lebensbedingungen erforderlich ist. Die in der DNS gespeicherte Information kann jedoch von der Zelle bei Bedarf abgerufen werden, z. B. wenn für eine zusätzliche Stoffwechselleistung ein bestimmtes Enzym benötigt wird. Durch einen Regulationsmechanismus, der die Ausprägung des Enzyms kontrolliert, wird bewirkt, daß der entsprechende DNS-Abschnitt jetzt für die Zelle verfügbar ist. Dieser wird zunächst mit Hilfe eines Enzyms, der DNS-abhängigen RNS-Polymerase, auf die messenger RNS (mRNS) überschrieben (Transkription). Die Information wird also nicht direkt an der DNS verwirklicht, sondern erst nachdem sie in Form der mRNS zu den Orten der Proteinsynthese, den Ribosomen, transportiert worden ist. Hier vollzieht sich nun die Übersetzung (Translation) der in der mRNS festgelegten zu DNS komplementären Basenfolge in die Aminosäuresequenz des Proteins. Als zusätzliche Faktoren fungieren dabei die Transfer-Ribonukleinsäuren, mit denen die Aminosäuren in einer energiereichen Bindung vorliegen, wie sie für die zu knüpfende Peptidbindung

erforderlich ist. Die einzelnen Aminosäuren mit den für sie spezifischen tRNS-Arten zu koppeln, ist Aufgabe der Aminoacyl-tRNS-Synthetasen.

Die Vorgänge der Transkription und Translation laufen bei den Mikroorganismen in enger räumlicher Assoziation und zeitlicher Aufeinanderfolge ab. So ließ sich etwa durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an Hand geeigneter Objekte zeigen, daß sich an die gerade von der DNS transkribierte noch wachsende mRNS Ribosomen anlagern, an denen gleichzeitig mit der Synthese von Protein begonnen wird.

2) Transkription und Translation bei Eukaryonten

Viele der an Mikroorganismen gewonnenen Erkenntnisse der Genexpression gelten auch für alle anderen Organismen. Bei den Eukaryonten (Organismen mit echtem Zellkern) treten jedoch manche Unterschiede auf, die durch besondere Erscheinungen bedingt sind.

Während sich die Zellen z. B. einer Bakterienkultur einander völlig gleichen, können die Zellen eines vielzelligen Organismus im Laufe ihrer Reifung verschiedenartige Formen und Funktionen annehmen. Diese Vorgänge, die dazu führen, daß Tochterzellen andere Funktionen annehmen als ihre Elternzellen, werden unter dem Begriff der Differenzierung zusammengefaßt, über deren genetische Kontrolle bisher noch wenig bekannt ist.

Auch der Bau der Eukaryontenzelle bringt gegenüber der Prokaryontenzelle eine zusätzliche Komplizierung mit sich. Fast die gesamte DNS der Zelle ist in dem kugeligen Körper des Zellkerns lokalisiert. Während der Interphase ist die DNS gleichmäßig über das Kerninnere

verteilt. Nur die Nukleolen erscheinen vor diesem homogenen Hintergrund als morphologisch charakterisierte Gebilde. Sie sind Orte der Synthese ribosomaler RNS. Die DNS im Zellkern ist nicht "nackt", wie etwa die E.coli-DNS, sondern sie ist mit Proteinen, den basischen Histonen und den Nichthistonproteinen, assoziiert. Der als Chromatin bezeichnete DNS-Protein-Komplex tritt in zwei Formen auf. Das dichtgepackte Heterochromatin soll³ DNS-Abschnitte umfassen, die für die Genexpression nicht verfügbar sind, während am locker strukturierten Euchromatin mRNS-Synthese erfolgen soll.

Vor Beginn der Zellteilung und während der Teilung kondensiert sich das Chromatin zu stäbchenförmigen Gebilden, den Chromosomen, deren Zahl und Form für einen gegebenen Organismus charakteristisch sind.

Die den Zellkern umgebende Kernmembrane ist von Poren durchbrochen, die so eine kontinuierliche Verbindung mit dem Cytoplasma und den sich dort befindlichen Ribosomen herstellen. Diese können entweder an die Membranen des endoplasmatischen Retikulums angeheftet sein oder als freie Ribosomen im "unstrukturierten" Cytoplasma mit der mRNS als Polysomen vorliegen.

Auf welche Weise die Informationsübermittlung von der DNS, die bei Eukaryonten zum Teil in sich wiederholenden DNS-Sequenzen (BRITTEN und KOHNE, 1968) vorliegt, zu den räumlich entfernten Orten der Proteinsynthese im Cytoplasma erfolgt, ist ein noch weitgehend ungeöstes Problem. Es wird jedoch allgemein angenommen, daß die mRNS an Protein gebunden in Form von Partikeln (dRNPs) von den Kernen ins Cytoplasma transportiert wird.

3) Morphologie und mögliche Funktion der dRNP-Partikel (30 S-dRNP-Partikel)

In den postribosomalen Fraktionen cytoplasmatischer Extrakte von Fischembryonen (SPIRIN et al., 1964) und Seeigeln (SPIRIN und NEMER, 1965) wurden zuerst Ribonukleoproteine mit heterogener Sedimentationsverteilung gefunden, die schnellmarkierbare DNS-ähnliche RNS enthielten und die sich aufgrund dieser und anderer Eigenschaften nicht in die Klasse der ribosomalen Partikel einordnen ließen. Es zeigte sich bald, daß diese dRNP-Partikel, für die von SPIRIN (1969) die Bezeichnung "Informosomen" vorgeschlagen wurde, als charakteristische Bestandteile in den verschiedensten tierischen Zellen auftreten. So wurden freie dRNP-Partikel in cytoplasmatischen Extrakten der Rattenleber (QUIRIN-STRICKER und MANDEL, 1969; HENSHAW und LOEBENSTEIN, 1970; SUGANO et al., 1971), des Rattengehirns (SAMEC, JACOB und MANDEL, 1968), der Schafsschilddrüse (CARTOUZOU, POIREE und LISSITZKY, 1969), von L-Zellen (PERRY und KELLY, 1968), HeLa-Zellen (OVCHINNIKOV et al., 1969; SPOHR et al., 1970) und weiterer tierischer Gewebe aufgefunden. Neben diesen freien dRNP-Partikeln kommen im Cytoplasma auch an Polysomen (PERRY und KELLY, 1968; HENSHAW, 1968; SCHWEIGER und HANNIG, 1970; OLSNES, 1970) und an Mikrosomen (SAMEC et al., 1968) gebundene dRNP-Partikel unterschiedlicher Größe vor.

Die Existenz vergleichbarer dRNP-Strukturen im Zellkern, wo diese Partikel in größerer Menge als im Cytoplasma vorkommen, wurde von SAMARINA, KRICHEVSKAYA und GEORGIEV (1966) mit der Isolierung von 30 S-dRNP-Partikeln gezeigt. Später konnten im Zellkern in Anwesenheit von RNAase-Inhibitor, der die Spaltung der hochmolekularen

dRNS durch Endonukleasen verhindert, ebenfalls dRNP-Partikel unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden (SAMARINA, LUKANIDIN, MOLNAR und GEORGIEV, 1968), deren Sedimentationskoeffizienten von 30 S, 45 S, 60 S, 75 S bis 130 S reichen.

Nach den Vorstellungen dieser Autoren entstehen diese di-, tri-, usw. oligomeren Formen dadurch, daß 30 S-Partikel durch unterschiedlich lange dRNS-Stränge verbunden werden, die sich auf die globuläre Proteinstruktur der 30 S-Partikel auflagern sollen.

Außer einigen besonderen Fällen, wie z. B. den dRNP-Partikeln aus Retikulocyten, die die mRNS für Hämoglobin tragen (HUEZ et al., 1967; BURNY et al., 1969) oder den dRNPs aus Zellen, die mit RNS-Viren infiziert worden waren (ZAIDES et al., 1970; ZASLAWSKY et al., 1971), wurde für die Mehrzahl der dRNP-Partikel aus tierischen Zellen, stammen sie nun aus dem Cytoplasma oder dem Kern, eine weite Sedimentationsverteilung gefunden. Darin spiegelt sich der Umstand wieder, daß die dRNS in diesen Partikeln ebenfalls heterogen in ihrer Größe ist. Sie unterscheidet sich von der ribosomalen RNS außerdem durch ihre schnelle Markierbarkeit mit radioaktiven Nukleinsäurevorstufen und durch ihre DNS-ähnliche Basenzusammensetzung, die aufgrund ihrer hohen Hybridisierbarkeit mit DNS nachgewiesen wurde (SPIRIN und NEMER, 1965; INFANTE und NEMER, 1968; PARSONS und McCARTY, 1968; FAIFERMAN, HAMILTON und POGO, 1970). Trotz der Heterogenität in ihrer Größe besitzen die dRNP-Partikel doch immer einen definierten Proteinanteil, der hauptsächlich nach der Schwebedichte im CsCl-Gradienten bestimmt wurde. Dabei wurden für die dRNPs aus Kernen und dem Cytoplasma jeweils Werte um 1,4 gefunden, nach denen mit Hilfe einer empirischen

Formel (SPIRIN, 1969) der Proteinanteil auf 75 % und der RNS-Anteil auf 25 % geschätzt wurde. Direkte chemische Bestimmungen, die an dRNP-Partikeln aus Kernen durchgeführt wurden, ergaben für das Protein einen Anteil von 80 % und für die RNS von 20 % (SAMARINA et al., 1967; FAIFERMAN, HAMILTON und POGO, 1970).

Um die Bedeutung des relativ hohen Proteinanteils der dRNP-Partikel aufzuklären, wurden verschiedene Untersuchungen an diesen Proteinen (hauptsächlich den Proteinen der dRNP-Partikel aus Kernen) durchgeführt (KRICHEVSKAYA und GEORGIEV, 1969; ISHIKAWA, KURODA und OGATA, 1970; SCHWEIGER und HANNIG, 1968). Gewöhnlich wurden dabei diskoelektrophoretische Verfahren angewandt, wie die Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei pH 4,5 und in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat. Diese beiden Methoden ergaben jedoch vollständig unterschiedliche Proteinbandenmuster; so wurde nach Reduktion des Gesamtproteins bei saurem pH nur eine Proteinbande gefunden, dagegen traten in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat 10 - 15 Komponenten auf. Es wurde daher von einigen Autoren (KRICHEVSKAYA und GEORGIEV, 1969) die Ansicht vertreten, daß die dRNP-Struktur relativ einfach sein müsse, während andere (NIESSING und SEKERIS, 1971) eine sehr komplizierte Zusammensetzung für die Partikel annahmen. Bis jetzt war es jedoch nicht möglich, die bestehenden Unstimmigkeiten auf der Grundlage experimenteller Hinweise auszuräumen.

Da den dRNP-Partikeln aus Kernen, wie aufgrund enzymatischer Untersuchungen (NIESSING und SEKERIS, 1970) anzunehmen ist, eine wichtige Rolle beim Processing und der Auswahl der mRNS vor ihrem Transport ins Cytoplasma zuzukommen scheint, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Proteine der 30 S-dRNP-Partikel aus Kernen einzeln zu identifizieren und zu charakterisieren. Diese Untersuchungen, die frühere Arbeiten

(SCHWEIGER und HANNIG, 1968 und 1970) fortsetzen, führten zu dem Schluß, daß die Proteine der Rattenleberinfosomen nur begrenzt heterogen sind. Darüberhinaus scheint es, daß die meisten der hochmolekularen Proteinbanden, die bei der Diskelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat gefunden werden, künstlich entstehen, und ihr Auftreten von den Bedingungen, die bei der Zerstörung der dRNP-Partikel angewendet werden, abhängt. Einem der gereinigten Proteine konnte eine mögliche Funktion, als RNS-bindende Komponente, in den intakten Partikeln zugeschrieben werden.

AUFGABENSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit sollten Proteine isoliert und charakterisiert werden, die in Ribonukleoproteinpartikeln (30 S- oder dRNP-Partikel) des Zellkerns der Rattenleber an DNS-ähnliche RNS gebunden sind.

Diese Arbeiten standen in Zusammenhang mit Untersuchungen, die sich mit "RNS-bindenden" Proteinen des Cytoplasmas und Proteinen cytoplasmatischer dRNP-Partikel befassen und sollten einen Vergleich der Proteine der beiden Partikel-Typen ermöglichen.

Einen weiteren Anstoß, frühere Arbeiten über die Proteine der dRNP-Partikel aus Zellkernen wieder aufzunehmen, gaben unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Befunde über die Proteinzusammensetzung dieser Partikel, die in letzter Zeit publiziert worden waren.

Es sollte ferner untersucht werden, ob sich in 30 S-Partikeln aus Kernen anderer Gewebe und Spezies Proteine mit vergleichbaren Eigenschaften nachweisen lassen.

Bei der Isolierung und Charakterisierung der Proteine sollten moderne elektrophoretische Verfahren angewandt werden.

ERGEBNISSE

I. Auswahl des Untersuchungsmaterials

Bei der Entscheidung, die Untersuchungen an Rattenleber durchzuführen, wurden folgende Gesichtspunkte berücksichtigt:

1. Die Ergebnisse sollten mit Befunden aus der Literatur direkt vergleichbar sein, die fast ausschließlich in Arbeiten über Partikelproteine aus Rattenleberkernen erhalten worden waren.
2. Wie sich in vergleichenden Voruntersuchungen zeigte, ist Lebergewebe besonders geeignet, um daraus größere Mengen von Zellkernen schnell und mit hinreichender Reinheit zu isolieren. Außerdem war die Ausbeute an dRNP-Partikeln groß genug, um eine erfolgreiche Fraktionierung durchzuführen.
3. Rattenleber eignet sich, als stoffwechselintensives Gewebe, besonders gut für Versuche zur radioaktiven Markierung von RNS.

II. Versuche zur Isolierung der dRNP-Partikel aus Zellkernen

1) Isolierung von Zellkernen

Zur Isolierung von Zellkernen aus verschiedenen Geweben sind zahlreiche Verfahren beschrieben worden, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können: in Methoden mit nichtwässerigen und Methoden mit wässerigen Medien.

Bei nichtwässerigen Verfahren, die auf der Technik von BEHRENS (1932) basieren, werden organische Lösungsmittel von geeigneter spez. Dichte zur Homogenisierung von Geweben benutzt, die zuvor in gefrorenem Zustand zermahlen

und dann lyophilisiert wurden. Die Isolierung der Kerne erfolgt durch Differential- oder isopyknische Zentrifugation. Diese Verfahren haben den Vorteil, daß sie Verluste an wasserlöslichen Substanzen weitgehend vermeiden. Nachteile sind das Auftreten von Proteindenaturierungen durch organische Lösungsmittel, die geringe morphologische Erhaltung der Zellkerne und ausgedehnte Verunreinigungen durch cytoplasmatische Bestandteile.

Dagegen sind Verfahren, bei denen wässerige Medien benutzt werden, schneller und leichter durchzuführen, und die Zellkerne sind in vielen Fällen gut erhalten.

Bei der wässerigen Methode sind viele Abwandlungen beschrieben worden. So sind zum Beispiel Homogenisatoren aus Glas (POTTER und ELVEHJEM, 1936) oder Stahl (EMANUEL und CHAIKOFF, 1957) zur Homogenisierung von Geweben benutzt worden. Ebenso variieren die Homogenisierungsmedien von Zitronensäurelösungen (STONEBURG, 1939), isotonischen oder hypertonischen Saccharoselösungen (HOGEBOOM, SCHNEIDER und PALADE, 1948), Zuckerlösungen, die durch Ca^{2+} (SCHNEIDER und PETERMAN, 1950) oder Mg^{2+} (PHILPOT und STANIER, 1956) ergänzt werden, bis zu Lösungen, die Detergenzien enthalten (FISCHER und HARRIS, 1962). Schließlich kann die Trennung der Zellkerne von Cytoplasma, die durch Zentrifugalkraft erfolgt, durch unterschiedliche Zentrifugationen, wie z. B. gegen eine Zone hoher Dichte oder in einem Dichtegradienten, bewirkt werden.

Ein sehr häufig angewandtes Verfahren, von dem es viele Modifikationen gibt, wurde von CHAUVEAU et al. (1956) beschrieben. Es nutzt die unterschiedlichen Dichten der einzelnen Zellbestandteile zur Abtrennung der Zellkerne in einem Dichtemedium aus. Bei diesem Einstufenverfahren wird das Gewebe direkt in 2,2 M Saccharose homogenisiert.

Durch hochtourige Zentrifugation des Homogenats werden die Kerne, die auf Grund ihres Chromatingehalts schwerer sind als die übrigen Zellbestandteile, sedimentiert, während Mitochondrien und ganze Zellen einschließlich der Erythrocyten im Zentrifugenröhrchen nach oben steigen (flotieren).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellkerne nach einem Verfahren von POGO, ALLFREY und MIRSKY (1966) isoliert, das eine Modifikation der CHAUVEAU-Methode darstellt. Dabei wird, durch die Einführung eines weiteren Isolierungsschrittes, die Reinheit der Zellkerne gegenüber der Original-Methode wesentlich verbessert. Nach Homogenisieren des Gewebes in isotonischer Saccharose-lösung wird bei diesem Zweistufenverfahren zunächst eine Trennung der rohen Kernfraktion von cytoplasmatischen Bestandteilen durch eine Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit erreicht. Das erhaltene Sediment wird dann in 2,4 M Saccharose suspendiert, und die Suspension einer hochtourigen Zentrifugation unterworfen.

Die isolierten Kerne erscheinen im Phasenkontrastmikroskop gut erhalten; Nukleoplasma, nukleäre Bestandteile und intakte Kernmembranen sind erkennbar. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten außerdem, daß der Anteil an cytoplasmatischen Verunreinigungen, den diese Präparationen aufwiesen, sehr gering war. Das Verhältnis RNS/DNS lag bei 0,2 und stimmte z. B. mit den von POGO, ALLFREY und MIRSKY angegebenen Werten überein. Die durchschnittliche Ausbeute an Kernen, bezogen auf DNS betrug 60 - 70 % der Gesamt-DNS des Homogenats.

2) Extraktion der Zellkerne

Zur Isolierung von dRNP-Partikeln aus Zellkernen sind verschiedene Verfahren beschrieben worden. SAMARINA, KRICHEVSKAYA und GEORGIEV (1966) extrahierten die Partikel durch Behandlung der Zellkerne mit gepufferten isotonischen Salzlösungen bei leicht alkalischem pH. Durch Aufbrechen der Zellkerne in der sogenannten French Press (FAIFERMAN, HAMILTON und POGO, 1970) oder durch Ultraschall (PARSONS und McCARTY, 1968) können ebenfalls RNP-Partikel freigesetzt werden. Von einer temperaturabhängigen Extraktion der dRNP-Partikel aus Rattenleberzellkernen, die zudem von ATP stimuliert wird, wurde von ISHIKAWA, KURODA und OGATA (1968) berichtet.

Das zuerst genannte Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit zur Isolierung der dRNP-Partikel angewandt.

Es weist folgende Vorteile gegenüber den anderen Verfahren auf:

- 1.) Bei einer Extraktionstemperatur von 0 - 2° C (Eis-temperatur) werden enzymatische Veränderungen des Materials weitgehend vermieden.
- 2.) Die Struktur der Zellkerne bleibt erhalten; dadurch wird die Möglichkeit der unspezifischen Adsorption von Protein an dRNP-Partikel stark verringert. Bei Anwendung von Ultraschall, French-Press-Homogenisation oder von Puffern hoher Ionenstärke (HSB) zusammen mit DNAase sind dagegen sicherlich Proteinumlagerungen, an denen z. T. auch sogenannte Nichthistonproteine beteiligt sind, zu erwarten.
- 3.) Durch eine Vorextraktion der Kerne mit isotonischer Kochsalzlösung bei pH 7.0 werden adsorbierte Cytosol-Proteine und, was von besonderer Wichtigkeit ist, auch ein großer Anteil der löslichen Komponenten des Zellkerns (Nucleosol) entfernt. Dieser Vorgang stellt eine Reinigung

der dRNP-Partikel dar und zwar zu einem Zeitpunkt, zu dem die Partikel noch in der nativen chromatingebundenen Form vorliegen und deshalb weniger adsorptiven Vorgängen unterliegen.

Aus den pH 8.0 Extrakten werden die 30 S-RNP-Partikel durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen.

3) Reinigung der dRNP-Partikel im Dichtegradienten

Im pH 8.0-Extrakt sind die dRNP-Partikel enthalten, neben unterschiedlichen Mengen an Bestandteilen des Kernsafts und aus dem Cytosol adsorbierten Komponenten. Zur Reinigung der Partikel wurde in Anlehnung an GEORGIEV et al. (1966) die Methode der sogenannten Zonen-zentrifugation mit stabilisierenden Saccharosedichtegradienten angewandt.

Die relativ steil verlaufenden Gradienten (15 - 30 % Saccharose) werden vor der Zentrifugation hergestellt und mit der Probe überschichtet. Während der Zentrifugation, bei der Rotoren mit ausschwingbaren Bechern benutzt werden, sedimentieren die einzelnen Komponenten entsprechend ihrer Größe und Form. Nach der Trennung wird der Röhrcheninhalt fraktioniert, und man erhält die Komponenten in angereicherter Form.

Bei dieser Art von Dichtegradientenzentrifugation können nur relativ kleine Probenvolumina aufgetragen werden, in denen zudem die aufzutrennenden Substanzen in hinreichend hoher Konzentration vorliegen sollen. Für die Reinigung der dRNP-Partikel würde das bedeuten, daß die Zellkerne nur mit einer geringen Menge des STM-Puffers pH 8.0 extrahiert werden könnten, wobei die Partikel erfahrungsgemäß in sehr unvollständiger Ausbeute erhalten werden.

Es wurde deshalb zwischen Extraktion und Zentrifugation ein Konzentrierungsschritt durchgeführt. Die Partikel konnten so mit größeren Volumina des Extraktionsmediums

in höherer Ausbeute gewonnen werden. Es zeigte sich, daß die Ausbeute maximal war, wenn die Kerne mit 10 Vol. der isotonischen Kochsalzlösung behandelt wurden. Bei einer Relation von 1,5 : 1 wurden nur etwa 30 % der extrahierbaren dRNP-Partikel erhalten.

Um den Extrakt auf das für die Dichtegradientenzentrifugation geeignete Volumen zu bringen, wurde zuerst das Verfahren der Ultrafiltration (Diaflo Apparatur) angewandt. Dieses Verfahren erwies sich jedoch als ungeeignet, da mit zunehmender Konzentrierung Bestandteile des pH 8.0-Extrakts unlöslich wurden und ausfielen. Dabei wurden die Filtermembranen offensichtlich durch adsorbierte oder präzipitierte Proteine allmählich undurchlässig.

Die Partikel konnten schließlich durch eine Sedimentation aus dem pH 8.0-Extrakt konzentriert werden. Sie ließen sich so für die Dichtegradientenzentrifugation in einem kleinen Volumen des STM-Puffers leicht resuspendieren.

Die für die Konzentrierung nötigen Zentrifugationsbedingungen wurden folgendermaßen berechnet:
Zentrifugalbeschleunigung und Zentrifugationsdauer in Winkelrotoren, bei denen eine Substanz mit bekanntem Sedimentationskoeffizienten vollständig sedimentiert, wird ermittelt, indem eine Konstante (k), die für jeden Rotor verschieden ist, durch den Sedimentationskoeffizienten der Substanz bei Maximalbeschleunigung in Svedbergeinheiten (S) dividiert wird. Man erhält so die Sedimentationszeit (t).

$$t \text{ (std)} = \frac{k}{S}$$

Der sogenannte "clearing" Faktor oder k Faktor kann mit

folgender Formel berechnet werden:

$$k = \frac{\frac{R_{\max}}{R_{\min}}}{\omega^2} \times \frac{10^{13}}{3600}$$

wobei: $R_{\max}$ = größter Abstand von der Drehachse

$R_{\min}$ = kleinster Abstand von der Drehachse
(Winkelgeschwindigkeit in rad/sec)

ω = 0,10472 x UpM

Für die hier vorliegende kleinste Partikelgröße von dRNP (30 S) ergibt sich bei Verwendung des Rotors 50 in der Spinco Ultrazentrifuge (Beckman Instruments) und einer Zentrifugalbeschleunigung von 150000 x g eine Sedimentationszeit von 2,5 h.

Ein Vorteil der Sedimentation liegt auch darin, daß z. B. niedermolekulare Komponenten weitgehend abgetrennt werden, vor allem wenn die dRNP-Partikel durch eine Schicht (Cushion) von 0,5 M Saccharose (PARSONS und McCARTY, 1968) zentrifugiert werden.

Dieses Anreicherungsverfahren schuf eine wesentliche Voraussetzung, daß die RNP-Partikel in Mengen erhalten werden konnten, die eine Isolierung der Proteinanteile in präparativem Maßstab gestatteten.

Die Partikel wurden durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Abb. 1 zeigt die typische Verteilung der Extinktionen bei 260 und 280 nm nach Zentrifugation des resuspendierten Sediments. Die Menge der in diesem Versuch eingesetzten RNP-Partikel entspricht dem aus 5 Lebern gewonnenen Material.

Der bei Fraktionen 12 - 17, etwa in der Mitte des Gradienten liegende Gipfel enthält monomere dRNP-Partikel mit einem Sedimentationswert von 30. Diese Fraktionen

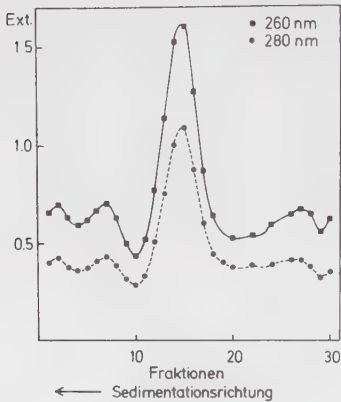


Abb. 1 Sedimentationsverteilung der dRNP-Partikel aus Zellkernen von Rattenleber. 2 ml einer Resuspension der Partikel nach Sedimentation wurden auf 29 ml eines 15 - 30 %igen Saccharosegradienten in STM-Puffer pH 8.0 überschichtet und 14 h bei 23000 UpM im Rotor SW 25,1 in der Spinco Ultrazentrifuge Modell 2 - 50 B (Beckman Instruments) zentrifugiert. (■—■-Ext.260, ●—●-Ext.280)

zeigen ein durchschnittliches Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm (260/280) von 1,48, das auf eine Zusammensetzung der Partikel aus Protein und Nukleinsäure hinweist (SAMARINA, KRICHEVSKAYA und GEORGIEV, 1966).

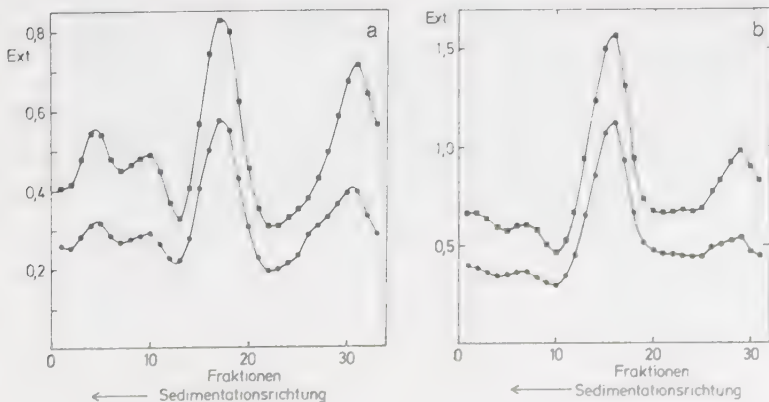
Im oberen Bereich des Gradienten steigen die Werte der Extinktionen wieder an. Der Verlauf dieses Anstiegs war etwas unterschiedlich und offensichtlich abhängig von der Aufarbeitung. Es zeigte sich, daß auch in diesen Fraktionen Proteine vorliegen, die in der diskoelektrophoretischen Analyse ein ähnliches Bild zeigen wie Proteine intakter 30 S-Partikel.

Im unteren Abschnitt des Gradienten (Fraktionen 1 - 9) bemerkt man weitere kleine Gipfel, die auf Komponenten höherer Sedimentationsgeschwindigkeit hinweisen, bei denen es sich nach den gefundenen optischen Werten ebenfalls um RNS-Protein-Komplexe handelt.

Das hier beschriebene Sedimentationsprofil gleicht einem von FAIFERMAN, HAMILTON und POGO (1971) angegebenen Bild einer Dichtegradientenzentrifugation von dRNP-Partikeln, die unter Verwendung von RNAase-Inhibitor aus Rattenleber-Cytosol gewonnen wurden. Andere Autoren (GEORGIEV et al., 1966; MOULE und CHAUVEAU, 1968; NIESSING und SEKERIS, 1970) haben nach Isolierung der RNP-Partikel in Abwesenheit von RNAase-Inhibitor nur einen Gipfel der Partikel-Monomeren gefunden, für den Sedimentationskoeffizienten von 30 - 45 S angegeben wurden. Das Auftreten von RNP-Fraktionen mit S-Werten größer als 30 deutet möglicherweise darauf hin, daß bei der hier beschriebenen Reinigung ein höherer Anteil oligomerer dRNP-Partikel isoliert wird.

4) dRNP-Partikel aus Kernen anderer Gewebe und Spezies

Um der Arbeit eine breitere Basis zu geben, sollten neben den Proteinen der Partikel aus Rattenleberkernen auch Proteine aus Partikeln anderer Gewebe und Spezies untersucht werden.



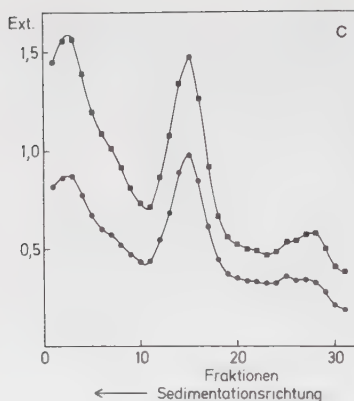


Abb. 2 Sedimentationsverteilung von dRNP-Partikeln aus Zellkernen a) der Rattenniere, b) der Mausleber, c) der Meerschweinchenleber. Die Zentrifugationsbedingungen waren die gleichen, wie sie in Abbild. 1 für dRNP-Partikel aus Rattenleberkernen wiedergegeben sind.
(—■—■—Ext.₂₆₀, —●—●—Ext.₂₈₀)

Es wurden dRNP-Partikel aus einem weiteren Rattengewebe, der Niere und aus Kernen der Leber von Maus und Meerschweinchen isoliert. Die Aufarbeitung wurde dabei ebenfalls nach dem für Rattenleber geschriebenen Schema durchgeführt, um zu vergleichbaren Aussagen zu gelangen.

Die Ausbeute an Zellkernen und der daraus extrahierten dRNP-Partikel war bei den 3 genannten Geweben ähnlich und auch in der Reinheit vergleichbar.

Die Abbildungen 2a, b und c zeigen die Sedimentationsverteilungen von Extrakten aus Kernen der Niere (a), Maus- (b), und Meerschweinchenleber (c) im Dichtegradienten. Aus den Kurven geht hervor, daß Gipfel auftreten, die dem 30 S-Gipfel im Falle des Extrakts aus Leberkernen entsprechen und die ähnliche Verhältnisse

der Extinktionen bei 260 und 280 nm (260/280), nämlich 1,48 - 1,52, aufweisen. Die Ausbeute an 30 S-Partikeln, bezogen auf Leber-Naßgewicht, war bei Maus und Meerschweinchen etwa gleich wie bei der Ratte, während sie bei der Rattenniere nur etwa ein Drittel davon beträgt.

Ebenso wie bei der Dichtegradientenzentrifugation von dRNP-Partikeln aus Rattenleber, treten bei Niere (a) und Mausleber (b) zwei, bei Meerschweinchenleber (c) ein Gipfel auf, die vor dem 30 S Peak liegen und die offensichtlich Nukleoprotein-Partikel enthalten.

b) Vorläufige Unterteilung der Proteine der 30 S-Partikel nach ihrem diskelektrophoretischen Verhalten

Wenn Proteine der 30 S-Partikel durch PAA-Diskelektrophorese in Anwesenheit von SDS und unter Standardbedingungen getrennt werden, ergibt sich eine heterogene und komplexe Verteilung färbbarer Banden oder Zonen. Die Bandenmuster waren ähnlich denen von NIESSING und SEKERIS (1971) und FAIFERMAN, HAMILTON und POGO (1971) beschriebenen Bildern.

Abbildung 3 zeigt die Photographie eines Disk-Stäbchens, welches die typische Bandenverteilung wiedergibt. Es wird daraus klar, daß eine Unterteilung und Kennzeichnung der einzelnen Banden notwendig wurde, auf die im weiteren Verlauf dieser Arbeit Bezug genommen werden wird. Eine Unterteilung in 3 Hauptzonen, die jeweils Komponenten eines Molekularbereiches enthalten, wurde eingeführt:

- 1.) Der Abschnitt I in einem Bereich des Stäbchens, der dem Start am nächsten liegt, weist 5 - 6 z. T. sehr schwach ausgeprägte Komponenten auf, für welche Molekulargewichte von 86000 - 165000 berechnet wurden (siehe IV, 1) b).

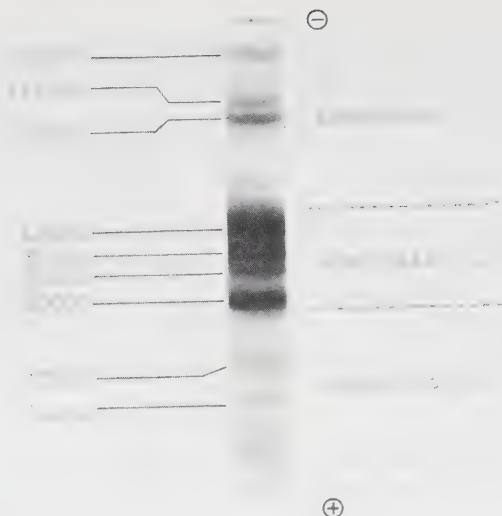


Abb. 3 Diskelektrophoretische Auftrennung der Gesamtproteine von 30 S-dRNP-Partikeln aus Zellkernen der Rattenleber in Anwesenheit von SDS. Die Unterteilung des in 10 %igen Gelen erhaltenen Proteinbandenmusters erfolgte nach Molekulargewichtsbereichen. Abschnitt I umfaßt den Bereich mit MG 86000 - 165000, Abschnitt II den mit 42000 - 25000, und Abschnitt III den von 25000 - 10000.

- 2.) In Abschnitt II liegen 4 Komponenten, darunter die Hauptkomponenten, mit Molekulargewichten zwischen 42000 und 25000.
- 3.) Im Abschnitt III werden 2 - 3 schwächere Komponenten sichtbar, deren Molekulargewichte zwischen 25000 und etwa 10000 liegen.

III. Dissoziation der dRNP-Partikel mit Hilfe von 5 M Harnstoff und präparative Trennung der Kompo- nenten durch trägerfreie Ablenkungselektrophorese

1) Proteine aus Rattenleberkernen

Es mußte zunächst versucht werden, zur Trennung und Identifizierung von Proteinen der 30 S-Partikel diese Proteine von der RNS-Komponente abzutrennen.

Dies kann auf verschiedene Weise erreicht werden. GEORGIEV et al., (1969) entfernten die RNS durch enzymatischen Abbau mit RNAase oder durch Chromatographie der Partikel an DEAE-Cellulose in Anwesenheit von Harnstoff. Eine weitere Möglichkeit, die beiden Komponenten ebenfalls in Anwesenheit von Harnstoff durch trägerfreie Elektrophorese nach HANNIG (1964) zu trennen, wurde von SCHWEIGER und HANNIG (1968) beschrieben. Dieses Verfahren basiert auf einer Arbeit von SARKAR (1967), in der RNS- und Proteinanteil des TMV-Virus bei pH 10,5 elektrophoretisch getrennt worden waren. Die Dissoziation von Protein und RNS durch Harnstoff war eine der beiden prinzipiellen Möglichkeiten, schwache nicht kovalente Bindungen des Ribonukleoprotein-Komplexes aufzuheben. Die andere Möglichkeit ergibt sich aus der Verwendung von Puffern hoher Ionenstärke. Dieses 2. Verfahren ist nicht praktikabel, wenn die Komponenten des RNP durch trägerfreie Elektrophorese getrennt werden sollen.

Da in der vorliegenden Arbeit neben der Trennung der dRNP-Proteine auch die von SCHWEIGER und HANNIG (1968) beschriebene Methodik untersucht werden sollte, wurde die Dissoziation der Partikel durch Harnstoff angewandt.

Diese Dissoziation der 30 S-Partikel in RNS- und Proteinanteil war damals dadurch erreicht worden, daß zu den entsprechenden Fraktionen des Dichtegradienten fester

Harnstoff bis zu einer Endkonzentration von 4 M zugegeben wurde. Das Material war anschließend gegen Kammerpuffer mit 4 M Harnstoff dialysiert worden, wobei auch die für den Dichtegradienten verwendete Saccharose entfernt wurde. Um das Retentat vor der Trennung in der trägerfreien Elektrophorese einzulängen, wurde es durch Ultrafiltration in Kollodium-Membranröhrchen konzentriert.

Diese Art der Aufarbeitung brachte jedoch Verluste, vor allem durch ausfallendes Material während der Konzentrierung, mit sich. Daher wurden die 30 S-Partikel aus Fraktionen des Dichtegradienten durch Sedimentation konzentriert und direkt durch Zugabe des harnstoffhaltigen Kammerpuffers dissoziiert. Durch diese Modifikation des ursprünglichen Verfahrens konnte auch eine lange Dialyse zur Entfernung der Saccharose umgangen werden. Die völlig klare Lösung der Partikel in Harnstoff-Puffer wurde einer Trennung in der trägerfreien Elektrophorese unterworfen.

Bei dem Verfahren der trägerfreien kontinuierlichen Ablenkungselektrophorese strömt zwischen zwei Glasplatten, die sich in geringem Abstand voneinander befinden, ein Pufferfilm (Kammerpuffer), dem eine hohe Gleichspannung anliegt. In diesen Pufferfilm wird das aufzutrennende Stoffgemisch kontinuierlich eingespritzt. Während der vertikalen Bewegung mit dem Kammerpuffer werden die Teilchen entsprechend ihrer Ladung im elektrischen Feld abgelenkt und beim Austritt aus der Trennkammer auf 96 Fraktionen verteilt.

Die Dissoziation der sedimentierten Partikel und die Trennung ihrer Komponenten wurde zunächst unter Verwendung von Tris/Cl-Puffer, pH 8,4, 4 M Harnstoff durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß das Material in drei Komponenten

mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit separiert wird. Durch Änderung der Trennbedingungen wurde versucht, die Auftrennung zu verbessern. Schließlich konnte durch die Erhöhung der Harnstoffkonzentration auf 5 M und den Ersatz des Tris/Cl⁻ durch Tris/PO₄-Puffer, pH 8,2, eine Trennung in drei klar voneinander abgesetzte Abschnitte erreicht werden.

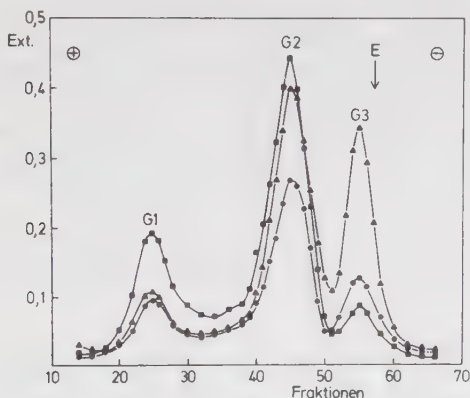


Abb. 4 Auftrennung von RNS und Protein der 30 S-dRNP-Partikel aus Rattenleberkernen in der trägerfreien, kontinuierlichen Ablenkungselektrophorese nach HANNIG in Anwesenheit von 5 M Harnstoff. Vor der Elektrophorese wurden sedimentierte 30 S-Partikel in 1,6 ml Kammerpuffer (5 M Harnstoff, 0,01 M Tris/PO₄, pH 8,2) dissoziiert. Diese Lösung wurde über der Fraktion 57 (E = Einspritzstelle) in die Kammer eingespritzt. (-▲—▲—Ext. 235, -■—■—Ext. 260, -●—●—Ext. 280)

Abbildung 4 gibt die Verteilungskurven der bei 235, 260 und 280 nm gemessenen Extinktionen der Fraktionen wieder,

wenn der zuletzt genannte Puffer als Kammerpuffer verwendet wird. Am weitesten anodisch abgelenkt im Bereich der Fraktionen 21 - 29 erscheint ein Gipfel (G1), bei dem es sich, nach dem Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm (260/280) von ca. 2,0, um freie RNS handelt. Nur wenig abgelenkt im Bereich der Fraktionen 52 - 58 nahe der Einspritzstelle (Fraktion 57) erscheint ein symmetrischer Gipfel (G3), der nach den gemessenen optischen Werten Protein, ohne Verunreinigung durch Nukleinsäuren, enthält. Zwischen G1 und G3 erscheint im Bereich der Fraktionen 41 - 49 noch ein dritter Gipfel (G2), der von SCHWEIGER und HANNIG in der früheren Arbeit nicht gefunden worden war. Wie aus dem Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm zunächst zu entnehmen war, muß in diesen Fraktionen neben Protein auch ein beträchtlicher Anteil an Nukleinsäuren enthalten sein.

2) a) Bestimmung der Verteilung von Protein und schnellmarkierbarer RNS (dRNS) in Fraktionen nach der trägerfreien Elektrophorese

Die Bestimmung von Protein in den einzelnen Fraktionen nach der trägerfreien Elektrophorese zeigte, daß die Gipfel G2 und G3 Protein enthalten (Abb. 5). Auf G2 entfallen dabei 30 - 35 % und auf G3 65 - 70 % des Gesamtproteins der dissoziierten Partikel.

Ebenfalls in Abbildung 5 dargestellt ist die Verteilung der mit ^{14}C -Orotsäure als Vorstufe markierten "schnellmarkierbaren" oder dRNS. (Zur Trennung in der trägerfreien Elektrophorese wurde unmarkiertes Material zugesetzt.) Hierbei wurden zwei Gipfel mit Radioaktivität gefunden, die im Bereich G1 und G2 liegen. Wie erwähnt dürfte es sich bei G1 um freie RNS handeln.

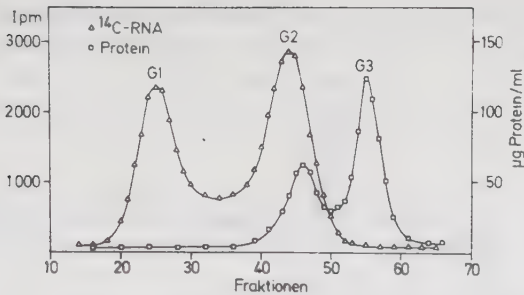


Abb. 5 Verteilungskurven von Protein und in vivo mit ^{14}C -Orotsäure markierter dRNS nach Trennung der 30 S-Partikel-Komponenten in der trägerfreien Elektrophorese. (□—□— µg Protein/ml; —△—△— Ipm/min Radioaktivität)

Der zweite Gipfel (Fraktionen 41 - 49) erscheint im Bereich des mittleren Peaks G2. Bei dem hier vorliegenden markierten Material handelt es sich wahrscheinlich um RNS, deren Bindung an Protein durch 5 M Harnstoff nicht aufgehoben wurde. Aufgrund der Aktivitätsverteilung kann der Anteil der nicht dissoziierten RNS mit über 50 % angegeben werden. Auch aus der elektrophoretischen Beweglichkeit muß man schließen, daß diese RNS nicht in freier Form, sondern als Ribonukleoprotein vorliegt.

b) Analytische Trennung von Protein in Fraktionen nach der trägerfreien Elektrophorese

Die Proteinbestimmung in den einzelnen Fraktionen nach der trägerfreien Elektrophorese hatte gezeigt, daß die Gipfel G2 und G3 Protein enthalten. Die Auftrennung dieser Proteine durch analytische Diskelektrophorese brachte folgendes Ergebnis:

G3 enthält ausschließlich Protein (Abb. 6; Fraktionen 52, 54, 56, 58), das in der Natriumdodecylsulfat Diskelektrophorese in der Zone mit Molekulargewicht 42000 in Ab-

schnitt II wandert, d. h. G3 enthält das Hauptprotein der dRNP-Partikel.

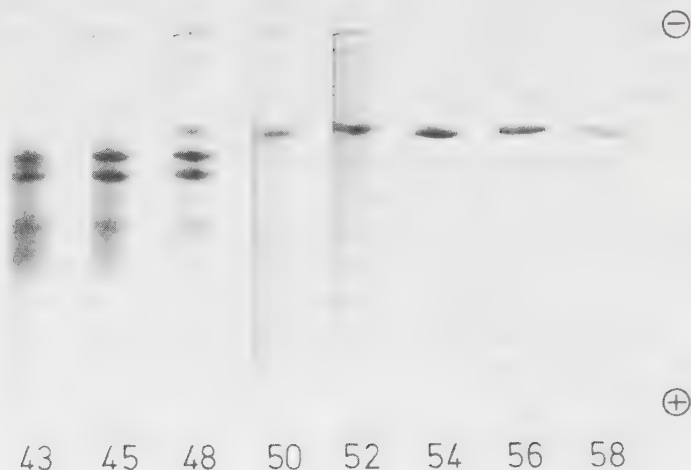


Abb. 6 SDS-Diskelektrophorese von Proteinen der 30 S-Partikel in Fraktionen nach der trägerfreien Elektrophorese. Fraktionen 43, 45, 48 Protein in G2; Fraktionen 52, 54, 56, 58 Protein in G 3.

Es war somit zu erwarten, daß im mittleren Gipfel G2 die restlichen bei der Auftrennung der Gesamtproteine sichtbaren Proteinkomponenten vorliegen sollten. Diese Vermutung bestätigte sich. Auf den Gelstäbchen ergab sich (ähnlich wie auf Abb. 3, Seite 20) ein komplexes Muster mit zahlreichen zum Teil kurzlaufenden Banden. Es zeigte sich bald, daß hochmolekulare Komponenten (Abschnitt I) mit unterschiedlicher und nicht reproduzierbarer Stärke und Verteilung in den Fraktionen von G2 auftraten. Dieses Verhalten schien auf eine mögliche Beziehung dieser Banden untereinander oder zu den niedermolekularen Banden hinzudeuten.

Durch Änderung der Zusammensetzung des Trennpuffers in der trägerfreien Elektrophorese gelang es, die auf den SDS-Stäbchen sichtbare Bandenverteilung zu beeinflussen (siehe Abschnitt V, Seite 46).

3) Proteine der Partikel aus Kernen anderer Gewebe und Spezies

Die aus Kernen der Rattenniere, Maus- und Meerschweinchenleber gewonnenen dRNP-Partikel wurden wie unter III. 1) beschrieben dissoziiert und ihre Komponenten durch trägerfreie Elektrophorese aufgetrennt.

Aus den Abbildungen 7 a), b), c) geht hervor, daß auch hier eine klare Auftrennung in drei Abschnitte (G1 - G3) erreicht werden kann: G1 mit freier RNS, die am weitesten zur anodischen Seite abgelenkt wird, G2 mit Protein und RNS und ein nahe der Einspritzstelle gelegener Gipfel G3. Im Falle der Partikel aus Meerschweinchenleber erscheint G1 sehr niedrig (Abb. 7 c). Dagegen ist der mittlere Gipfel G2 im Vergleich zu G2 der Partikel von Rattenleber, -niere und Mausleber verstärkt.

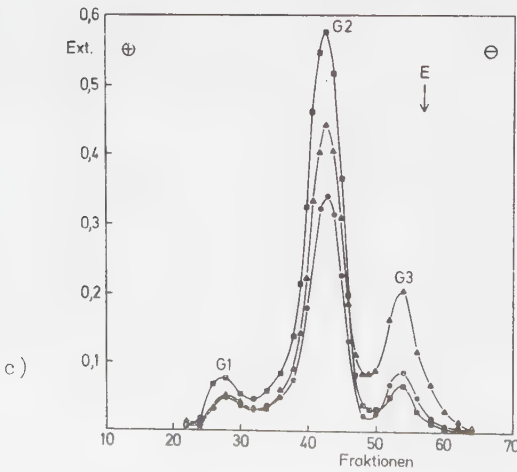
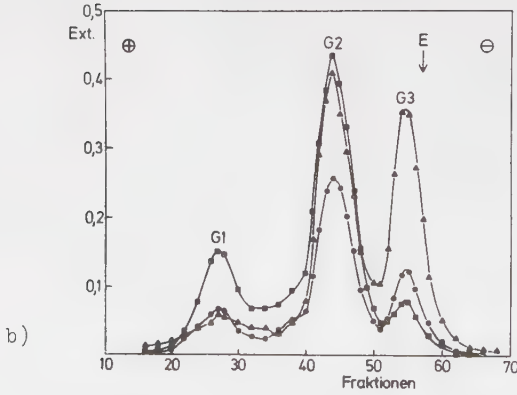
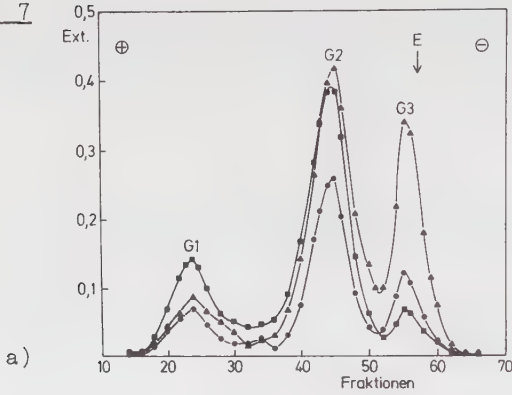
Wie bei der Trennung der Partikel der Rattenleberkerne, enthält auch G3 aus Partikeln der Rattenniere, Maus- und Meerschweinchenleber nur Protein, das der Zone mit Molekulargewicht 42000 in Abschnitt II entspricht. Seite 41 IV. 2) Hauptprotein der Partikel aus Kernen anderer Gewebe und Spezies.

Abb. 7 Trennung von Komponenten der 30 S-dRNP-Partikel, nach deren Dissoziation mit 5 M Harnstoff, in der trägerfreien Elektrophorese.

- a) 30 S-Partikel aus Rattennierenkernen
- b) 30 S-Partikel aus Kernen der Mausleber
- c) 30 S-Partikel aus Kernen der Meerschweinchenleber.

(-▲—▲-Ext. 235, -■—■-Ext. 260, -●—●-Ext. 280)

Abb. 7



IV. Charakterisierung des durch trägerfreie Elektrophorese abgetrennten "Hauptproteins" der 30 S-Partikel

1) Hauptprotein der 30 S-Partikel aus Rattenleberzellkernen

a) Prüfung der Homogenität durch Polyacrylamid-Diskelektrophorese

Der Gipfel über den Fraktionen (52 - 58), G3, enthielt ausschließlich Protein, das der oberen Bande in Abschnitt II entspricht. Da dieses Protein den Hauptbestandteil der 30 S-Partikel ausmacht, wird es hier als Hauptprotein bezeichnet. Die im registrierenden Photometer (Chromoscan) erhaltene Kurve einer SDS-Diskelektrophorese (Abb. 8) zeigt, daß das Hauptprotein eine etwas breite Zone bildet. Begleitproteine höherer oder niederer Molekularge-

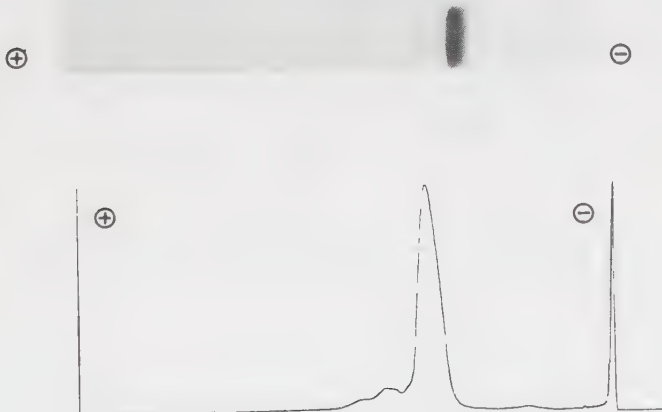


Abb. 8 a) Photographie, b) Densitogramm einer SDS-Diskelektrophorese des Hauptproteins in 10 %igem Polyacrylamid-Gel. (Das Densitogramm wurde mit einem Chromoscan, Joyce Loebl, aufgezeichnet.)

wichte fehlen fast völlig. Somit kann das Hauptprotein in diesem System als relativ einheitlich angesehen werden.

In der SDS-Elektrophorese erfolgt die Auftrennung der vorher denaturierten und reduzierten Proteine nach ihrer Molekülgröße. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, daß die in der SDS-Diskelektrophorese einheitliche Proteinzone Proteine derselben Molekülgröße, jedoch unterschiedlicher Ladung enthält. Daher wurde die Elektrophorese auch in einem System bei saurem pH durchgeführt, das Proteine nach ihrer Größe und Ladung auftrennt.

Diese Trennung des Hauptproteins erfolgte, ebenfalls in Polyacrylamidstäbchen, bei pH 4,5 in Anwesenheit von 8 M Harnstoff. Das Verfahren wurde von GEESTELAND und STAEHELIN (1967) für Ribosomenproteine angegeben.

Hierbei treten drei Proteinbanden auf (Abb. 9), zwei nahe beieinander liegende Banden und eine schwächere Bande, die etwa die halbe Strecke im Gel wandert.

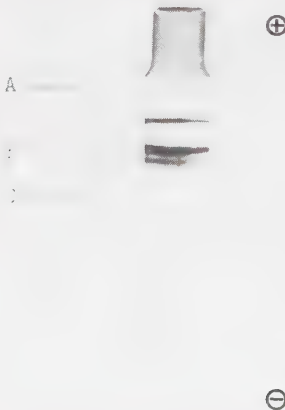


Abb. 9 Diskelektrophorese des Hauptproteins bei pH 4,5 in Anwesenheit von 8 M Harnstoff. A dimere, B reduzierte und C oxidierte Form des Hauptproteins.

Diese Verteilung entspricht derjenigen, die KRICHEVSKAYA und GEORGIEV (1969) für das Gesamtprotein der 30 S-Partikel gefunden haben. Sie bezeichneten die einzelnen Banden mit A, B und C. Dabei soll A (obere Bande) ein Oxidations-dimeres, B (mittlere Bande) die reduzierte und C (untere Bande) die oxidierte Form des Proteins darstellen. Für diese verschiedenen Formen werden -S-H Gruppen in der Polypeptidkette des Proteins verantwortlich gemacht. Wie diese Autoren ferner zeigen konnten, lassen sich durch Reduzierung die Formen der Banden A und C in die Form der Bande B überführen.

Eine Reduzierung des Hauptproteins (Protein aus Gipfel G3) vor der Diskelektrophorese bei pH 4,5 wurde auch in dieser Arbeit durchgeführt. Danach trat die Bande A (dimere Form) nicht mehr auf. Von der Bande C (oxidierte Form) waren jedoch meistens noch Spuren vorhanden, was sicherlich darauf zurückzuführen ist, daß während der Elektrophorese durch oxidierende Agenzien im Gel eine teilweise Rückumwandlung in die oxidierte Form eintritt.

Nachdem sich die drei Proteinbanden durch Reduzierung in eine Bande (B) überführen lassen, kann das Ergebnis der pH 4,5 Diskelektrophorese als weiteres Kriterium für die Einheitlichkeit des Hauptproteins gewertet werden.

b) Bestimmung des Molekulargewichts durch Diskelektrophorese unter Verwendung von Natriumdodecylsulfat

Mit Verfahren, wie sie die analytische Diskelektrophorese in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat oder bei pH 4,5 darstellen, konnten mit relativ geringen Substanzmengen weitere Eigenschaften des Proteins untersucht werden.

So kam zur Bestimmung des Molekulargewichts die bereits beschriebene Methode der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Betracht, die sich hierfür als sehr zuverlässig er-

wiesen hat. (DUNKER und RUECKERT, 1969; LESNAW und REICHMANN, 1970; SWANK und MUNKRES, 1971)

SHAPIRO, VINUELA und MAIZEL (1967) haben als erste berichtet, daß sich die Molekulargewichte von Proteinen in Gegenwart des Detergens Natriumdodecylsulfat in Polyacrylamidgelen ermitteln lassen. An Hand von 40 Proteinen mit bekannten Molekulargewichten prüften WEBER und OSBORN (1969) bei verschiedenen Gelkonzentrationen die Zuverlässigkeit dieser Methode. Dabei stellte sich heraus, daß sie zur Molekulargewichtbestimmung fast aller untersuchten Proteine mit ebenso großer Genauigkeit - jedoch mit einem Bruchteil des Substanzbedarfs und des experimentellen Aufwandes - wie die Ultrazentrifugationsmethode (YPHANTIS, 1960) angewandt werden kann.

Vor der Analyse eines Proteins ist es erforderlich, eventuell vorhandene -S-S-Brücken zu reduzieren und das Protein zu denaturieren, d. h. Sekundär- und Tertiärstruktur zu zerstören. Durch die Bildung des SDS-Proteinkomplexes werden ursprüngliche Ladungen aufgehoben. Die relative elektrophoretische Beweglichkeit, mit der vorbehandelte Proteine im elektrischen Feld wandern, ist dann nur proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichts. Das unbekannte Molekulargewicht eines Polypeptids kann durch Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit mit Referenzsubstanzen, deren Molekulargewichte bekannt sind, bestimmt werden.

Die Bestimmung wurde nach WEBER und OSBORN (1969) in 10 %igen Polyacrylamidgelen mit sehr guter Reproduzierbarkeit durchgeführt. Die Vergleichsproteine und das Hauptprotein wurden einzeln aufgetragen und getrennt (Abb. 10). Zur Herstellung einer Eichkurve wurden die Molekulargewichte der Vergleichsproteine halblogarithmisch gegen ihre

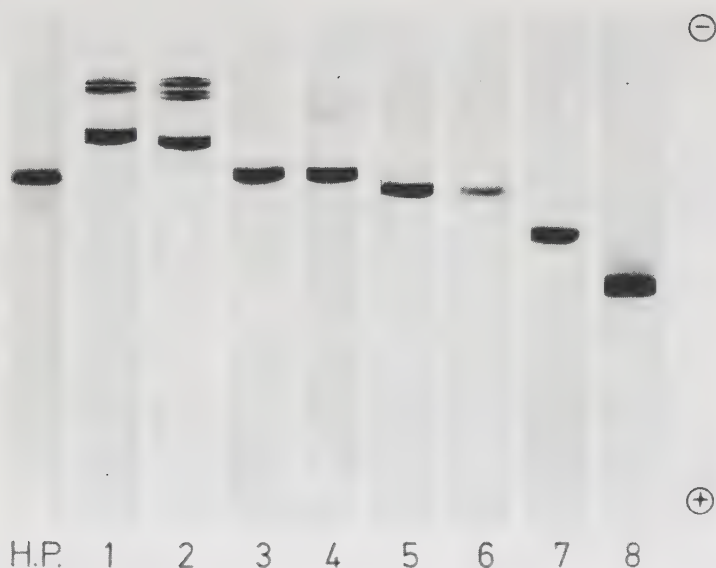


Abb. 10 Molekulargewichtsbestimmung in 10 %igen PAA-Gelen in Anwesenheit von SDS. Es sind Photographien angefärbter Gele einiger Vergleichsproteine und des Hauptproteins wiedergegeben. 1) Albumin (68000), 2) Catalase (60000), 3) Ovalbumin (43000), 4) Aldolase (40000), 5) Lactatdehydrogenase (36000), 6) Pepsin (35000), 7) Chymotrypsinogen (25700), 8) Ribonuklease (13700), H.P. = Hauptprotein.

relative Beweglichkeit aufgezeichnet (Abb. 11). An Hand der Eichkurve konnte für das Hauptprotein ein Molekulargewicht von 42000 ± 2000 ermittelt werden. Dieser Wert stimmt mit dem von KRICHESKAYA und GEORGIEV (1969) angegebenen Molekulargewicht des von ihnen isolierten Proteins der 30 S-Partikel überein.

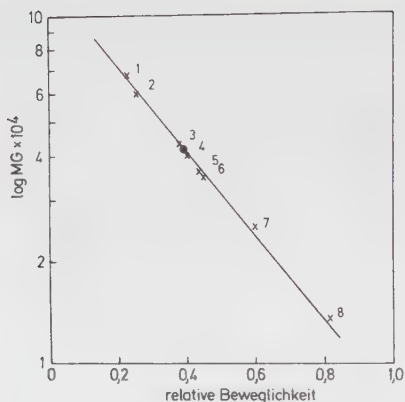


Abb. 11 Eichkurve zur Ermittlung unbekannter Molekulargewichte von Proteinen. Die bekannten Molekulargewichte der Vergleichsproteine 1 - 8 (siehe Abb. 10) wurden in logarithmischen Maßstab gegen die relative Beweglichkeit der Proteine in den Gelen aufgetragen. ● - Hauptprotein.

c) Bestimmung des isoelektrischen Punktes durch isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgelen

Das Verfahren der isoelektrischen Fokussierung, das die Auftrennung von Proteinen nach ihren isoelektrischen Punkten und die genaue Ermittlung ihrer isoelektrischen Punkte ermöglicht, wurde von VESTERBERG und SVENSON (1966) entwickelt.

Als isoelektrischer Punkt von Ampholyten, zu denen auch die Proteine gehören, bezeichnet man den pH Wert, bei dem sich positive und negative Teilladungen des Ampholyt-Moleküls aufheben. Werden Proteine in einem pH-Gradienten elektrophoretisch getrennt, so wandern sie solange, bis sie zu Gradientenpositionen gelangen, bei denen ihre Nettoladung gleich null ist.

Der an diesen Positionen ermittelte pH-Wert entspricht den isoelektrischen Punkten der getrennten Proteine.

Zur Herstellung von pH-Gradienten werden sogenannte Trägerampholine (Fa. LKB Broma, Schweden) verwendet. Dies sind aliphatische Polyamino-Polycarboxylsäuren mit niedrigem Molekulargewicht. Sie besitzen untereinander kleine Unterschiede in ihren isoelektrischen Punkten, die gleichmäßig über einen bestimmten ausgewählten pH-Bereich verteilt sind.

Das Verfahren kann in präparativem Maßstab in einer Glassäule mit überlagerten stabilisierenden Zuckergradienten oder analytisch als Diskelektrophorese in Polyacrylamidgel ausgeführt werden.

Bei der isoelektrischen Fokussierung des Hauptproteins wurde die analytische Modifikation des Verfahrens nach HAYES und WELLNER (1969) angewandt. Dabei werden Ampholine und Proteinproben in das Polyacrylamidgel einpolymerisiert. Nach Anlegen der Spannung bilden die Ampholine einen pH-Gradienten aus. Das anfangs auf das ganze Gel verteilte Protein wandert bis zu pH-Werten, die den isoelektrischen Punkten entsprechen und bildet dort scharfe Zonen, d. h. es wird fokussiert.

Nach dem Ende der in diesem Fall 10 - 12 Stunden dauernden Fokussierung wird das Gel zur Bestimmung des pH-Gradienten in gleichmäßig dünne Scheibchen geschnitten, die mit Wasser eluiert werden. Die pH-Werte des Eluats werden mit Hilfe eines pH-Meters gemessen. Ein anderes Gel mit der gleichen Proteinprobe wird angefärbt, um die Lage der Proteinbande(n) zu bestimmen.

Nach der isoelektrischen Fokussierung des Hauptproteins, die in Anwesenheit von 6 M Harnstoff ausgeführt wurde, waren auf den Gelstäbchen 5 - 6 nahe beieinanderliegende Protein-

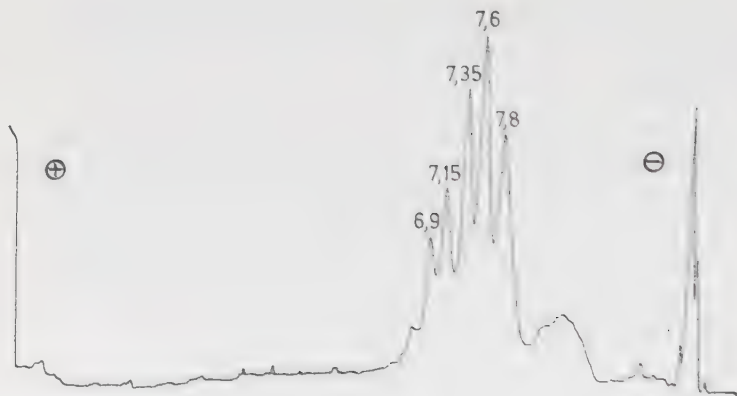


Abb. 12 Isoelektrische Fokussierung des Hauptproteins in PAA-Gelstäbchen in Anwesenheit von 6 M Harnstoff. Die nach Awdeh angefärbten Proteinbanden wurden vom Joyce Loebl Chromoscan registriert. Über den einzelnen Peaks sind die pH-Werte angegeben, die den jeweiligen isoelektrischen Punkten entsprechen.

banden zu sehen, d. h. dieses Protein ist mikroheterogen (Abb. 12). In mehreren Versuchen ergab sich, daß die einzelnen Banden immer mit der gleichen Intensität zueinander auftraten. Für sie konnten bei sehr guter Reproduzierbarkeit mit Hilfe der gemessenen pH-Gradienten (Abb. 13) isoelektrische Punkte von 6,9; 7,15; 7,35; 7,6; 7,8 bestimmt werden. Zur Kontrolle wurden auch Proteine fokussiert, für die sich isoelektrische Punkte ermitteln ließen, die mit den in der Literatur angegebenen Werten übereinstimmten.

Nachdem statt der zu erwartenden 1 - 2 Proteinbanden (oxidierte und reduzierte Form des Hauptproteins) noch zusätzliche Banden auftreten, stellt sich die Frage, ob

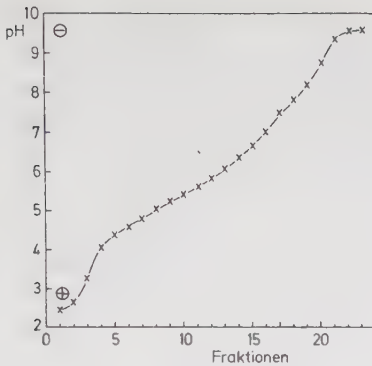


Abb. 13 pH-Gradient der Trägerampholyte (pH 3 - 10) im PAA-Gel zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte des Hauptproteins.

diese Verunreinigungen oder u. a. vielleicht Zustandsformen des Hauptproteins darstellen. Gegen die Möglichkeit einer Verunreinigung spricht die gleichbleibende Stärke, mit der die einzelnen Banden auftreten. Würde es sich bei einer oder mehreren Banden um Verunreinigungen handeln, so sollten diese bei verschiedenen Versuchen zur Isolierung des Hauptproteins unterschiedlich stark erscheinen und dadurch zu erkennen sein. Vielmehr deutet das Verhalten bei der isoelektrischen Fokussierung auf verschiedene Zustandsformen ein und desselben Proteins, nämlich des Hauptproteins, hin, wie das auch von einer Reihe anderer Proteine bekannt ist (HAYES und WELLNER, 1969; REGHETTI und DRYSALE, 1971; NOBUO UI, 1971).

d) Bestimmung der N-terminalen Aminosäure

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure gilt als sehr empfindlich für den Nachweis der Einheitlichkeit von Proteinen. Daher wurde diese Methode herangezogen, um zu

untersuchen, ob das in G3 isolierte Hauptprotein mehrere unterschiedliche Spezies enthält, welche durch isoelektrische Fokussierung getrennt werden, oder ob die hierbei gefundene Heterogenität auf verschiedene Ladungszustände ein und desselben Proteins zurückzuführen ist.

Das hier angewandte von GRAY und HARTLEY (1963) entwickelte Verfahren wurde von NEUHOFF, von der HAAR, SCHLIMME und WEISE (1969) in seiner Empfindlichkeit noch wesentlich verbessert. Es beruht auf der Umsetzung von Dansylchlorid mit der N-terminalen Aminosäure von Peptiden oder Proteinen zu einer säurebeständigen Verbindung. Diese Aminosäure liegt dann nach der sauren Hydrolyse als einzige Dansylaminosäure im Hydrolysat vor und kann als solche relativ leicht identifiziert werden. Dies geschieht nach zweidimensionaler Chromatographie des Gemisches auf beidseitig beschichteten Polyamid-Dünnschichtplatten, auf deren einer Seite die Probe und auf der anderen ein Testgemisch von Dansylaminosäuren aufgetragen werden. Dansylaminosäuren zeichnen sich durch grünlich-gelbe Fluoreszenz im UV-Licht aus.

Im Falle des Hauptproteins aus G3 konnte mit dieser Methode immer nur eine dansylierte Aminosäure auf der Polyamid-Schicht gefunden werden, die mit ziemlicher Sicherheit als Threonin identifiziert wurde.

Dieser Befund kann als Hinweis angesehen werden, daß sich das Hauptprotein der dRNP-Partikel nur aus einer Art von Protein zusammensetzt. Dabei muß allerdings vorausgesetzt werden, daß nicht weitere Komponenten vorhanden sind, die maskierte (z. B. durch Acetylierung) oder gleiche N-Termini aufweisen. Die Wahrscheinlichkeit für die letztere Möglichkeit scheint jedoch gering zu sein.

Tabelle 1 Aminosäurezusammensetzung des Hauptproteins.
Zum Vergleich sind die Aminosäurewerte aufgeführt, die
KRICHEVSKAYA und GEORGIEV (1969) und SARASIN (1969) für
das Gesamtprotein der 30 S-Partikel gefunden haben.

Aminosäure	diese Arbeit	Krichevskaya und Georgiev	Sarasin
	Hauptprotein	Gesamtprotein	Gesamtprotein
	Mol %	Mol %	Mol %
Lys	5,6	6,5	7,4
His	2,1	2,6	2,4
Arg	5,7	7,6	6,2
Asp	11,6	10,6	10,4
Thr	3,6	3,9	4,6
Ser	6,7	7,6	6,1
Glu	9,2	10,6	11,9
Pro	4,0	5,7	4,6
Gly	26,1	17,1	14,0
Ala	4,0	5,5	5,5
Cys	nicht bestimmt	0,86	0,9
Val	4,0	4,1	5,7
Met	0,0	0,0	2,0
Ileu	2,9	2,4	3,3
Leu	2,9	4,8	5,2
Tyr	6,5	4,5	4,0
Phe	5,5	4,2	5,1
Try	-	-	0,7
Verhältnis: <u>saure</u> basische Aminosäuren	1,55	1,28	1,39

e) Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäureanalyse des Hauptproteins, die an einem TSM Technicon Autoanalyser mit Säulen für basische und nichtbasische Aminosäuren durchgeführt wurde, ergab die in Tabelle 1 angegebenen Werte.

Zum Vergleich mit den in dieser Arbeit gefundenen Werten sind Analysen aufgeführt, die von KRICHEVSKAYA und GEORGIEV (1969), und SARASIN (1969) für das Gesamtprotein der dRNP-Partikel angegeben wurden. Besonders auffällig ist der hohe Glycinanteil von 26,1 Mol %, der beträchtlich über den von KRICHEVSKAYA und GEORGIEV und SARASIN berichteten Werten liegt.

Aufgrund des Gehaltes an sauren bzw. basischen Aminosäuren, der Relation saure/basischen Aminosäuren, sollte das Hauptprotein sauren Charakter zeigen und so z. B. bei pH 8,2 in der trägerfreien Elektrophorese weiter anodisch wandern. Da aber auch isoelektrische Punkte mit Werten um pH 7 gefunden wurden, ist anzunehmen, daß ein Teil der freien Carboxylgruppen der sauren Aminosäuren amidiert sind und diese Aminosäuren als Glutamin und Asparagin im Protein vorliegen.

2) Hauptprotein der Partikel aus Kernen anderer Gewebe und Spezies

Wie im eben beschriebenen Falle der dRNP-Partikel aus Rattenleberzellkernen, so konnte auch in den entsprechenden Strukturen der Rattenniere, Maus- und Meerschweinchenleber eine ähnliche Hauptproteinkomponente identifiziert werden.

Um festzustellen, ob es sich hierbei um vergleichbare bzw. identische Proteine handelte, wurden sie durch trägerfreie Elektrophorese isoliert und mit Methoden untersucht, die

zur Charakterisierung des Hauptproteins aus Rattenleberkernen herangezogen worden waren. Dabei zeigten sich folgende Ergebnisse:

Eine Analyse durch Polyacrylamid-Diskelektrophorese bei pH 4,5, die in diesen Fällen ohne vorhergehende Reduktion der Proteine durchgeführt wurde, ergab für alle drei Proben aus G3 der trägerfreien Elektrophorese das gleiche charakteristische Muster von 3 Banden, A-, B- und C-Bande (Abb. 14).

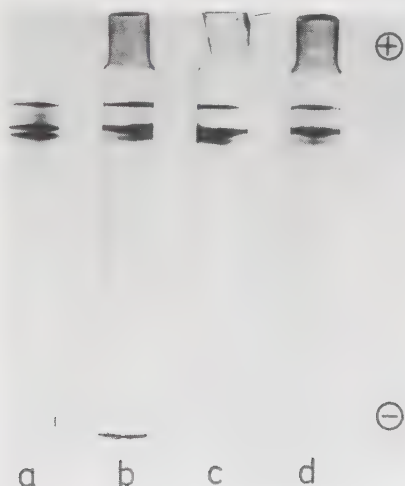


Abb. 14 Diskelektrophorese bei pH 4,5 (ohne Reduktion).
Hauptprotein der dRNP-Partikel aus Kernen der
a) Rattenleber, b) Rattenniere, c) Mausleber,
d) Meerschweinchenleber.

Nach Diskelektrophorese in dem SDS-System erscheint das G3-Protein aus Partikeln der Rattenniere und Mausleber als einheitliche etwas breite Bande, für die ein Molekulargewicht von jeweils 42000 berechnet wurde (Abb. 15). Das Protein aus G3 der Partikel aus Meerschweinchenleber bildet

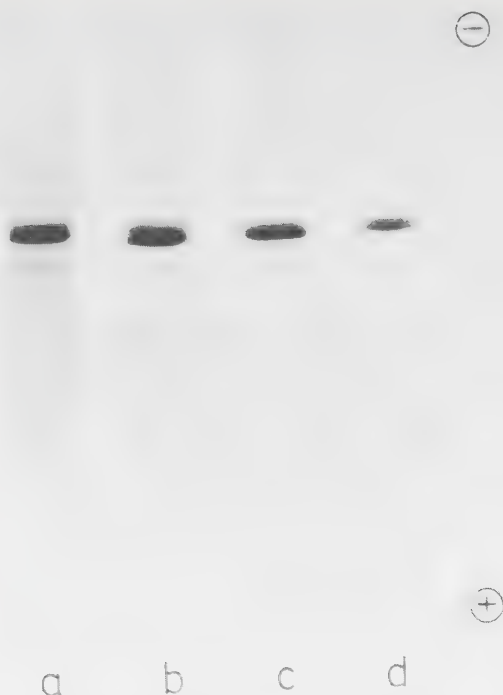
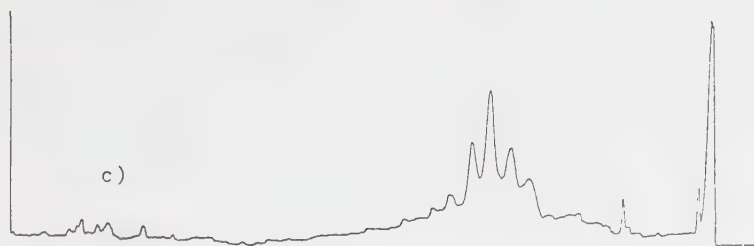
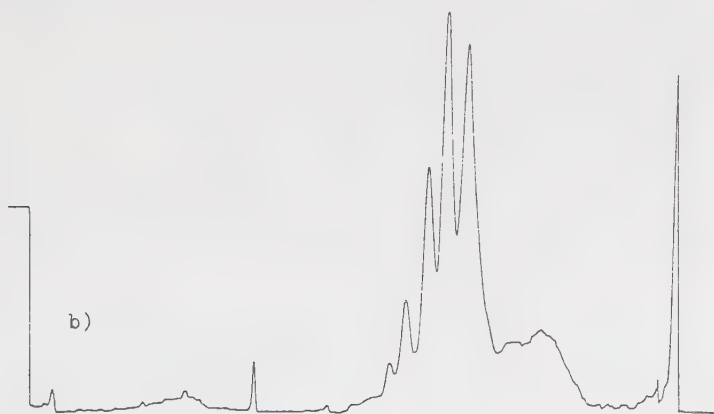
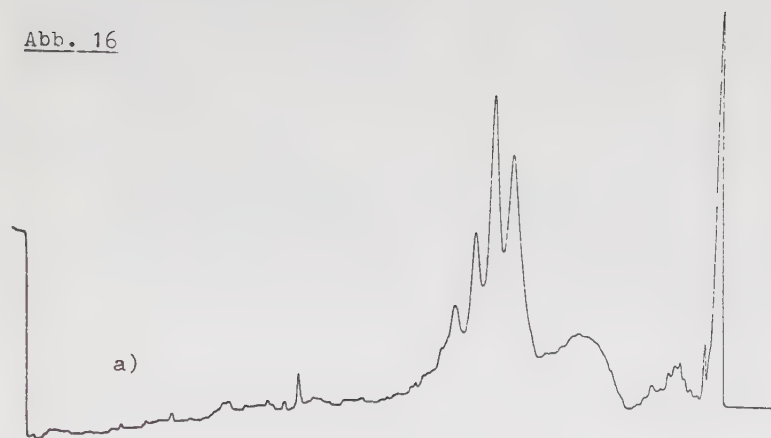


Abb. 15 Diskelektrophorese in Anwesenheit von Natrium-dodecylsulfat. Hauptprotein der dRNP-Partikel aus Kernen der a) Rattenleber, b) Rattenniere, c) Mausleber, d) Meerschweinchenleber.

Abb. 16 Isoelektrische Auftrennung im Ampholytgradienten (pH 3 - 10). Hauptproteine der dRNP-Partikel aus Kernen der a) Rattenniere, b) Mausleber, c) Meerschweinchenleber.

Abb. 16



⊕

⊖

zwei sehr nahe beieinanderliegende Proteinbanden mit Molekulargewichten von 42000 und 44000 (Abb. 15 d).

Bei der isoelektrischen Fokussierung der G3-Proteine aus den 3 angegebenen Organen zeigte sich eine ähnliche Mikroheterogenität, wie sie auch für das Hauptprotein aus Partikeln der Rattenleberkerne gefunden worden war (Abb. 16). Die isoelektrischen Punkte lagen ebenfalls im Bereich von pH 6,8 - 7,8. Auffallend war, daß die einzelnen Banden, die den isoelektrischen Punkten der Komponenten entsprechen, bei jedem Organ mit unterschiedlicher aber konstanter Intensität auftraten.

Bei der Bestimmung von N-terminalen Aminosäuren ließ sich für alle drei Protein-Präparationen jeweils nur eine dansylierte Aminosäure nachweisen und zwar exakt in der für das Protein aus Partikeln der Rattenleber gefundenen Position (Threonin).

Die Aminosäurezusammensetzung der G3-Fraktionen wurde ebenfalls bestimmt (Tabelle 2).

Wie aus der Gegenüberstellung hervorgeht, ergibt sich für die Proteine der G3-Fraktionen eine weitgehende Übereinstimmung der Aminosäurezusammensetzung. Besonders auffallend ist der bei allen untersuchten Proben wiederkehrende hohe Wert für Glycin.

Der Vergleich zeigte, daß die Hauptproteinkomponente (Fraktionen nach der trägerfreien Elektrophorese) der untersuchten dRNP-Partikel gleiche oder doch sehr ähnliche Eigenschaften besitzt. Es waren praktisch keine Unterschiede zwischen Leber und Niere aus Ratte und den Lebern von Ratte, Meerschweinchen und Maus festzustellen. Eine geringe Abweichung zeigte lediglich das Protein aus Kernen der Meerschweinchenleber in seinem Verhalten in der Polyacrylamid-Diskelektrophorese in Anwesenheit von SDS.

Tabelle 2 Aminosäureanalysen der G3-Fractionen aus dRNP-Partikeln der Rattenleber, Rattenniere, Maus- und Meerschweinchenleber.

Aminosäure	G3-Fractionen aus dRNP-Partikeln			
	Niere	Leber		
	Ratte	Ratte	Maus	Meerschweinchen
Lys	5,9	5,6	6,0	6,2
His	3,0	2,1	2,2	2,2
Arg	7,0	5,7	7,0	6,2
Asp	11,5	11,6	10,5	11,7
Thr	3,5	3,6	3,6	3,8
Ser	7,0	6,7	7,0	7,3
Glu	8,6	9,2	9,2	9,6
Pro	4,1	4,0	4,2	4,4
Gly	23,8	26,1	24,7	22,8
Ala	3,8	4,0	3,8	4,0
Val	4,7	4,0	4,3	3,9
Ileu	2,6	2,9	2,3	2,4
Leu	3,0	2,9	3,0	3,3
Tyr	6,3	6,5	6,4	6,6
Phe	5,2	5,5	5,8	5,4
Verhältnis: saure basische Aminosäuren	1,26	1,55	1,29	1,46

Aufgrund der hier sichtbaren weitgehenden Übereinstimmung bezüglich der Zusammensetzung und Eigenschaften des Hauptproteins konnte man annehmen, daß auch die Proteine der Fractionen G2 aus Kernen der oben genannten Gewebe sich nicht wesentlich unterscheiden würden. Somit schien es

ausreichend, weitere Versuche zur Isolierung und Charakterisierung der in G2 vorliegenden Proteine auf . Präparationen von dRNP-Partikeln aus Rattenleberkernen zu beschränken.

V. Hochmolekulare Proteinkomponenten der dRNP-Partikel aus Rattenleberkernen (Komponenten in Abschnitt I der SDS-Diskelektrophorese) und Hinweise für ihre artifizielle Entstehung

Bei den unter III. 2) b) (Seite 25) beschriebenen Untersuchungen ergaben sich Befunde, die wichtig erschienen im Hinblick auf die umstrittene Heterogenität der Proteine aus Informosomen der Zellkerne. So zeigte es sich, daß Komponenten des Bereiches G2 der trägerfreien Elektrophorese bei der Diskelektrophorese in Anwesenheit von SDS beträchtliche Unterschiede quantitativer und qualitativer Art aufwiesen. Manche Banden des Abschnitts I auf den Gelstäben verschwanden unter den schon erwähnten Bedingungen völlig.

Diese Befunde waren zunächst schwierig zu interpretieren. Eine Möglichkeit, das Auftreten von Komponenten mit offensichtlich hohen Molekulargewichten zu erklären, bestand darin, anzunehmen, daß es sich hierbei um sehr stabile Formen einer Aggregation von Bestandteilen niedrigen Molekulargewichts handeln könnte. In diesem Fall müßten zumindest einige der in Abschnitt I identifizierbaren Proteinbanden als Artefakte anzusehen sein, die während der Isolierung der dRNP-Partikel oder deren Proteine entstehen.

Nach KRICHEVSKAYA und GEORGIEV (1969) enthält das aus dRNP-Partikeln isolierte Gesamtprotein 4 Cysteinreste d. h. 4 Sulfhydryl-Gruppen. Diese könnten durch die

Ausbildung von besonders stabilen Disulfid-Brücken zwischen zwei oder mehreren Peptidketten Ursache für das Auftreten hochmolekularer Formen sein. Diese Möglichkeit wurde bereits von NIESSING und SEKERIS (1971) in Betracht gezogen. Diese Autoren konnten durch Reduktion mit 1 % Mercaptoäthanol (12 min bei 95° C) jedoch keine Änderung der Bandenverteilung auf Gelstäbchen nach SDS-Elektrophorese erhalten. Wurden die Proteine dagegen vor der Elektrophorese mit Perameisensäure behandelt, so verschwanden vier der am wenigsten weit im Gel laufenden Komponenten mit Molekulargewichten von 165000 - 400000. Die ebenfalls diskutierte Möglichkeit, daß Reste fest gebundener Nukleinsäuren, Glycoproteine oder Lipoproteine für das Phänomen verantwortlich seien, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Falls eine Zusammenlagerung oder Aggregation von Proteinen niedrigen Molekulargewichts (Abschnitt II oder III) erfolgen sollte, so mußte dies auf andere Weise geschehen.

Als möglicher Zeitpunkt für die Entstehung hochmolekularer Komponenten kam vor allem die Dissoziation der dRNP-Partikel in die Bestandteile RNS und Protein in Frage. Es schien vorstellbar, daß während der Zerstörung der geordneten Struktur der Partikel Bedingungen auftreten können, welche zur Ausbildung von Bindungen zwischen Proteinemolekülen führen, die sehr stabil und wohl irreversibel sind.

Die im folgenden beschriebenen Versuche bestärkten diese Annahme: Werden die dRNP-Partikel direkt aus den Fraktionen des Dichtegradienten mit TCE gefällt und in SDS-Inkubationslösung aufgenommen, so erhält man auf den Gelstäbchen das übliche Bild mit Proteinbanden in den Abschnitten I, II und III (Abb. 17 a).

Wird dieselbe Präparation der Partikel, vor der Fällung mit TCE dagegen auf eine Endkonzentration von 0,01 M



Abb. 17 SDS-Diskelektrophorese der Gesamtproteine der 30 S-Partikel nach unterschiedlicher Vorbehandlung. Einzelheiten im Text.

Tris-Phosphat, pH 8,2, 5 M Harnstoff gebracht und dann gefällt, so sind die Banden des Abschnitts I bis auf Spuren vermindert (Abb. 17 b).

Ähnliche Befunde wurden erhalten, wenn sedimentierte Partikel in dem eben genannten Puffer gelöst wurden (Abb. 17 c).

Diese Ergebnisse zeigen, daß offensichtlich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Proteinbanden des Abschnitts I und der Art, wie die 30 S-Partikel dissoziiert werden, besteht.

In weiteren Untersuchungen wurde gefunden, daß auf der anderen Seite z. B. hohe Ionenstärke oder/und langsame Dissoziierung der Partikel das Auftreten von Banden des Abschnitts I begünstigt.

Dies war der Fall, wenn dRNP-Partikel für ca. 6 h gegen 2 M NaCl dialysiert wurden. Dabei fiel ein Teil des Materials aus, in dem auf SDS-Gelstäbchen die Proteinbanden des Abschnitts I und die obere Bande des Abschnitts II (Hauptprotein) gefunden wurden (Abb. 18 b).

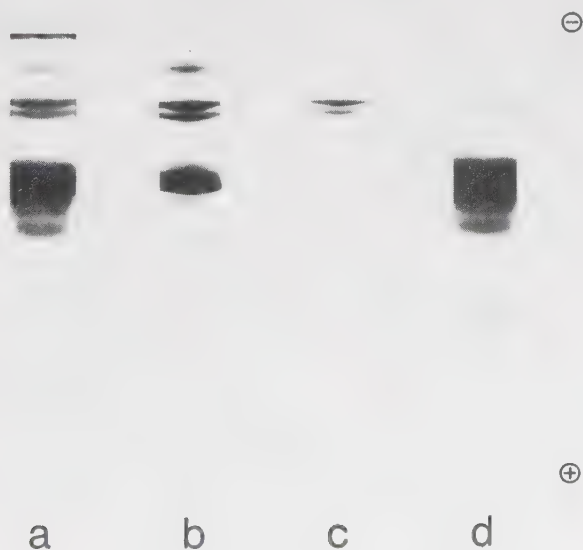


Abb. 18 SDS-Diskelektrophorese von Proteinen der 30 S-Partikel nach Behandlung mit 2 M NaCl. a) Lösliches Material b) Unlösliches Material c) Hochmolekulare Komponenten in Fraktionen 9 - 11 d) Protein in den oberen Fraktionen (14, 15, 16) des Dichtegradienten (Abb. 19).

Der gelöste Anteil des dialysierten Materials enthält Proteine der Abschnitte I, II und III mit einer deutlichen Verstärkung der Proteinbanden in Abschnitt I (Abb. 18 a).

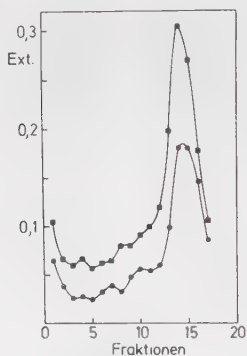


Abb. 19 Anreicherung von hochmolekularen Proteinkomponenten durch Zentrifugation des Retentats nach Behandlung der 30 S-dRNP-Partikel mit 2 M NaCl. 30 S-dRNP-Partikel aus den 30 S Peakfraktionen 15 - 30 %iger Saccharosegradienten wurden gegen 2 M NaCl dialysiert. 1 ml des Retentats wurde auf 12 ml eines 15 - 30 %igen Saccharosegradienten in 2 M NaCl geschichtet und 14 h bei 24000 UpM im Rotor SW 40 in der Spinco Ultrazentrifuge (Beckman Instruments) zentrifugiert. (■ — ■ - Ext. 260, ● — ● - Ext. 280)

Durch eine Zentrifugation des Retentats in 15 - 30 % Saccharosegradienten (Abb. 19) konnten die hochmolekularen Anteile angereichert werden (Abb. 18 c). Das kann als Beweis angesehen werden, daß diese Komponenten bereits vor der SDS-Elektrophorese in dieser Form vorliegen und nicht etwa durch Bedingungen vor oder während der Diskelektrophorese entstehen (z. B. durch spezifische Reaktionen mit dem Detergens).

Aus den gewonnenen Befunden kann mit einiger Sicherheit geschlossen werden, daß zumindest ein Teil der hochmolekularen Banden des Abschnitts I der Proteine aus dRNP-Partikeln als Artefakte anzusehen sind.

VI. Dissoziation der dRNP-Partikel mit 0,4 M KCl und Trennung der Komponenten durch Dichtegradientenzentrifugation

1) Isolierung und Charakterisierung eines löslichen niedermolekularen Proteins

Die bisherigen Untersuchungen hatten Hinweise dafür ergeben, daß die Anzahl der Proteine der dRNP-Partikel beschränkt ist und zwar auf 3 niedermolekulare Hauptkomponenten, welche bei der diskoelektrophoretischen Trennung (SDS) in den Abschnitten II und III aufgetreten waren.

Es wurde daher versucht, nach dem Hauptprotein vor allem auch die beiden Proteine mit Molekulargewicht 32000 und 25000 zu isolieren.

Hierzu wurde eine weitere Auftrennung der Proteinkomponenten des mittleren Bereiches G2 nach der trägerfreien Elektrophorese als wenig erfolgversprechend angesehen. So kamen etwa eine anschließende Chromatographie an Ionenaustauschern oder eine Auftrennung aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte im Ampholinegradienten wegen der geringen Ladungsunterschiede der Proteine, die sich aus ihrer etwa gleichen Beweglichkeit bei der VAP-Trennung ergeben, für eine weitere Reinigung nicht in Betracht. Einer Auftrennung der in der trägerfreien Elektrophorese gewonnenen Fraktionen des Bereiches G2 nach unterschiedlichem Molekulargewicht durch Gel-filtration standen die zu geringen Substanzmengen und

vor allem das Problem einer Konzentrierung dieser Fraktionen im Wege.

Bei der Isolierung der Proteine in Abschnitt II mit Molekulargewicht 25000, 32000 und 37000 sowie der Proteine in Abschnitt III wurde vielmehr von der Überlegung ausgegangen, daß sich diese Komponenten möglicherweise durch Puffer höherer Ionenstärke ablösen lassen, wie das bei Ribosomen (PETERMANN, 1964) bekannt ist. Diese Annahme wurde durch Untersuchungen von PERRY und KELLY (1968) bestärkt, in denen die Ablösung von Proteinen durch LiCl-Behandlung bei ribosomalen Untereinheiten und cytoplasmatischen dRNP-Partikeln aus L-Zellen verglichen wurde. Die Autoren konnten dabei zeigen, daß die stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration zu einer zunehmenden und selektiven Dissoziation und Abtrennung von Proteinen führt. Cytoplasmatische dRNP-Partikel scheinen wesentlich empfindlicher gegen höhere Ionenstärken zu sein; sie verlieren bereits bei 0,55 M LiCl etwa 75 % ihres Proteinanteils, während diese Behandlung bei Ribosomen nur relativ wenig Protein ablöst. Befunde von FAIFERMAN, HAMILTON und POGO (1971), über eine partielle Dissoziation der dRNP-Partikel bei 0,5 M NaCl gaben Anhaltspunkte für die zu wählende Ionenstärke.

Es wurde von Präparationen sedimentierter dRNP-Partikel ausgegangen, die für ca. 14 h (über Nacht) mit 0,03 M Tris/Cl, pH 8,4, 0,4 M KCl, 0,1 mM DTE, 0,1 mM EDTA behandelt wurden. Dabei wurden, wie die Überprüfung durch SDS-Diskelektrophorese zeigte, der größte Teil des Hauptproteins und eines Proteins, mit Molekulargewicht 37000 in Abschnitt II, unlöslich und fielen aus. Die restlichen Proteine aus Abschnitt II (MG 25000 und 32000) und III dissoziierten offensichtlich von den Partikeln ab und blieben in Lösung.

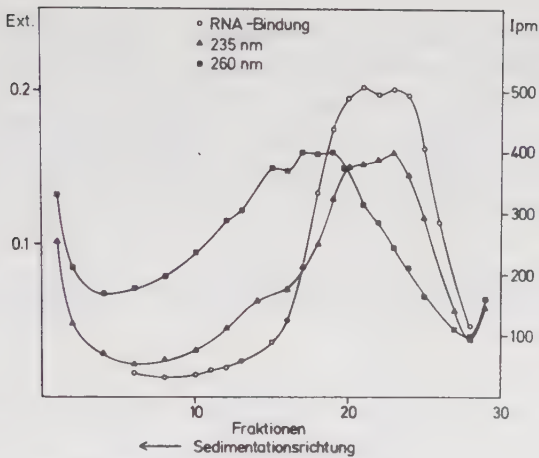


Abb. 20 Anreicherung von Protein mit in vitro Bindungsaktivität für RNS durch Dichtegradientenzentrifugation des 0,4 M KCl-Überstands der 30 S-dRNP-Partikel. 2 ml des 0,4 M KCl-Überstands wurden auf 11 ml eines 5 - 20 %igen Saccharosegradienten in 0,03 M Tris/Cl-Puffer pH 8,4, 0,1 mM DTE, 0,1 mM EDTA aufgetragen und 24 h bei 36000 UpM im Rotor SW 40 in der Spinco Ultrazentrifuge (Beckman Instruments) zentrifugiert. Zur Überprüfung der in vitro Bindungsaktivität wurden Aliquote aus den einzelnen Fraktionen entnommen und wie unter Material und Methoden, Punkt 7, beschrieben mit ^{14}C markierter Kern-RNS inkubiert. (—▲—▲—Ext. 235, —■—■—Ext. 260, —○—○—Ipm/min Radioaktivität).

Eine Fraktionierung dieser löslichen Bestandteile wurde durch Dichtegradientenzentrifugation erreicht. Abbildung 20 zeigt die Auftrennung nach einer 24-stündigen Zentrifugation bei 36000 UpM auf 5 - 20 %igen Saccharosegradienten. Nach den bei 260 und 235 nm gemessenen Extinktionen

kann eine grobe Trennung in zwei Bereiche unterschieden werden. Im Bereich der Fraktionen 14 - 22 liegt ein breiter Gipfel mit relativ hoher Extinktion bei 260 nm. Ein zweiter, teilweise überlappender Gipfel bei 235 nm (Fraktionen 19 - 25) deutet auf das Vorhandensein von Protein in diesen Fraktionen.

a) Nachweis der in vitro-Affinität des Proteins zu RNS

Aus Arbeiten von GEORGIEV et al., (1968) war bekannt, daß dRNP-Partikel des Zellkerns zusätzlich zu der gebundenen dRNS weitere RNS in vitro zu binden vermögen. Es war jedoch nicht klar, ob für diese Bindungsaktivität die Struktur der intakten Partikel Voraussetzung ist oder ob die Bindungsaktivität auch mit Partikelproteinen abgelöst werden kann. Aus diesem Grund schien es interessant, die im Dichtegradienten abgetrennten Protein-Fraktionen auf ihre RNS-Bindungskapazität zu prüfen.

Der Test wurde nach einem Verfahren durchgeführt (GIRARD und BALTIMORE, 1966), das auf folgendem Prinzip beruht:

"RNS-bindende" Proteine können mit RNS (homologe, heterologe RNS, ribosomale und DNS-ähnliche RNS) lockere Komplexe bilden. Um diese "Bindung" nachzuweisen, wird das zu untersuchende Protein oder Proteingemisch mit markierter RNS inkubiert und der Testansatz anschließend über eine Cellulosenitratmembran gesaugt. Hierbei werden freie Nukleinsäuren nicht zurückgehalten, während Proteine und Protein-RNS-Komplexe an die Membran gebunden werden. Die Radioaktivität des auf dem Filter adsorbierten Materials kann durch Messung ermittelt werden. Es besteht eine direkte Beziehung zwischen der

Konzentration RNS-bindender Proteine im Ansatz
und der ermittelten Radioaktivität der Membran.

Für den Dichtegradienten ergab sich hierbei, daß im Bereich der Fraktionen 19 - 25 ein Gipfel mit signifikanter Bindungsaktivität für RNS auftritt. Wie Abbildung 20 zeigt, erscheint der Verlauf fast parallel zu dem Profil der Extinktionen bei 235 nm. Dies würde bedeuten, daß die in diesem Bereich vorliegenden Proteine RNS-Bindungsaktivität besitzen.



Abb. 21 SDS-Diskelektrophorese von Proteinen in Fraktionen des Dichtegradienten nach Zentrifugation des 0,4 M KCl-Überstands. a) Fraktion 19
b) Fraktion 22 c) Fraktion 25

Die Analyse der einzelnen Fraktionen des Gradienten durch SDS-Diskelektrophorese bewies tatsächlich, daß nur im Bereich des Gipfels mit hoher Absorption bei 235 nm (Fraktionen 19 - 25) Proteine enthalten sind. Und zwar tritt im ganzen Bereich des Gipfels parallel zur Bindungsaktivität eine Bande, die untere Bande des Abschnitts II, auf (Abb. 21). Zusätzlich erscheinen bei den Fraktionen 19 - 23 in wesentlich geringerer Konzentration eine zweite etwas weniger weit laufende Zone des Abschnitts II und Spuren der Banden des Abschnitts III.

Aus diesen Befunden geht hervor, daß die RNS-Bindungsaktivität der unteren Bande in Abschnitt II zugeordnet werden muß. Die anderen Proteine sind wahrscheinlich in zu niedriger Konzentration vorhanden, um für die hohe in vitro-Bindungsaktivität in Frage zu kommen. Zudem wurde durch die vorherige Behandlung der Fraktionen mit Carboxymethyl-Cellulose, einem Kationenaustauscher, ausgeschlossen, daß kleine Mengen von Histonen (z. B. Histon F1) für die RNS-Bindung verantwortlich sein könnten.

b) Molekulargewicht und Aminosäurezusammensetzung des RNS-Bindungsproteins

Für das RNS-Bindungsprotein, das sich als identisch mit der untersten Bande in Abschnitt II erwies, wurde mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gel-Methode ein Molekulargewicht von 25000 bestimmt.

Die Aminosäurezusammensetzung des RNS-Bindungsproteins, zu deren Bestimmung Präparationen verwendet wurden, für die nach SDS-Gel-Densitogrammen (Abb. 22) ein Reinheits-

grad von 60 - 70 % abgeschätzt wurde, ist in Tabelle 3 wiedergegeben. Der Vergleich mit dem Hauptprotein (MG 42000) zeigt eine sehr ähnliche Aminosäurezusammensetzung dieser beiden Proteine. Der Wert für Glycin liegt allerdings beim RNS-Bindungsprotein erheblich niedriger, wobei bedacht werden muß, daß die Probe noch Spuren von Nukleinsäuren enthielt.

Tabelle 3 Aminosäureanalyse RNS-Bindungsprotein

Aminosäure	RNS-Bindungs- protein Mol %	Hauptprotein Mol %
Lys	7,3	5,6
His	4,4	2,1
Arg	5,8	5,7
Asp	10,0	11,6
Thr	4,2	3,6
Ser	6,5	6,7
Glu	11,0	9,2
Pro	4,2	4,0
Gly	19,3	26,1
Ala	5,4	4,0
Val	4,8	4,0
Ileu	2,9	2,9
Leu	3,9	2,9
Tyr	4,6	6,5
Phe	6,3	5,5
Verhältnis: <u>saure</u> basische Aminosäuren	1,30	1,55

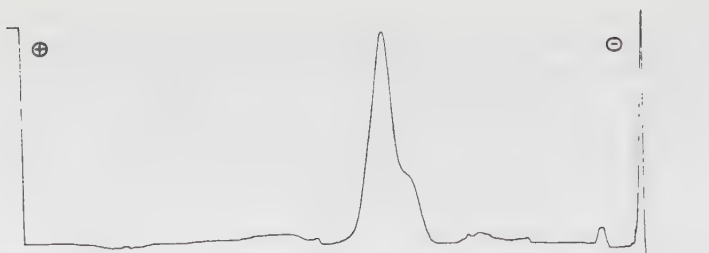


Abb. 22 Densitogramm eines SDS-Gels, auf dem angereichertes RNS-Bindungsprotein getrennt wurde.

2) Isolierung eines DNAase-empfindlichen Nukleoproteins

Unter den Bedingungen der Dichtegradientenzentrifugation, die zur Isolierung des RNS-bindenden Proteins geführt hatten, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß möglicherweise höhermolekulare Komponenten aus dem 0,4 M KCl-Extrakt auf den Boden des Zentrifugenröhrchens sedimentierten.

Daher wurde die Zentrifugationsdauer verkürzt. Es zeigte sich, daß der 0,4 M KCl-Extrakt eine weitere Komponente enthält, die mit etwa 20 S sedimentiert (Abb. 23 a). Nach den bei 260 und 280 nm gemessenen Extinktionen, die ein 260/280 Verhältnis von 1,6 ergaben, sollte es sich um Nukleoproteine handeln.

Die Analyse der Proteine des 20 S-Bereichs durch SDS-Diskelektrophorese ergab, daß hier Proteine vorliegen, die denen des Abschnitt III entsprechen (Abb. 24). Aufgrund ihrer Wanderung und Verteilung im Gel lag die Vermutung nahe, es könne sich bei diesen Proteinen um Histone handeln. Zur Überprüfung dieser Frage wurde eine weitere Trennung in einem Diskelektrophoresesystem bei pH 3,2 durchgeführt, das PANYIM und CHALKLEY (1969) für Histone beschrieben haben. Dabei konnten zwei Banden gefunden werden, die den Histonfraktionen F2b, F2a2 und

F2a1 der Vergleichshistone aus Kalbsthymus entsprechen (Abb. 25).

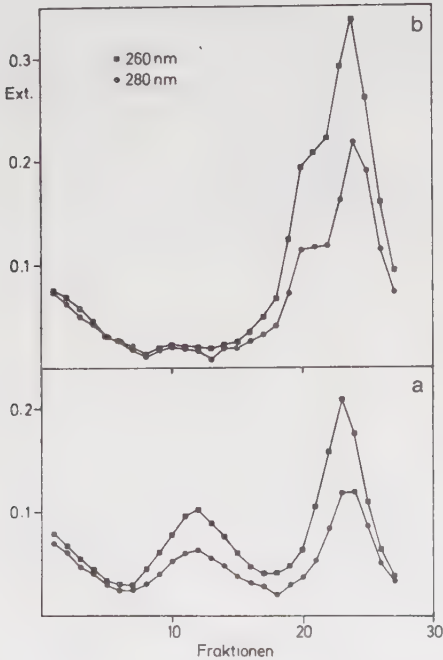


Abb. 23 a) Isolierung eines Nukleoproteinkomplexes aus dem 0,4 M KCl-Überstand durch Dichtegradientenzentrifugation. 1 ml des 0,4 M KCl-Überstands wurde auf 12 ml eines 5 - 20 %igen Saccharosegradienten (in 0,03 M Tris/Cl pH 8,4, 0,1 mM DTE, 0,1 mM EDTA) aufgetragen und 5,5 h bei 40000 UpM im Rotor SW 40 zentrifugiert. b) Zentrifugation des KCl-Überstands nach Behandlung mit DNAase unter Bedingungen wie a).

Abb. 24



Abb. 25



a b



a b



Abb. 24 Auftrennung von Proteinen des Nukleoprotein-
komplexes und Vergleichshistonen in der SDS-
Diskelektrophorese. a) Histone aus Kalbsthymus
b) Proteine des Nukleoproteinkomplexes.

Abb. 25 Auftrennung von Proteinen des Nukleoprotein-
komplexes und Vergleichshistonen aus Kalbs-
thymus in der Diskelektrophorese bei pH 3,2
in Anwesenheit von 6,25 M Harnstoff nach Panyim
und Chalkley. a) Vergleichshistone aus Kalbs-
thymus b) Proteine des Nukleoproteinkomplexes

Weitere Untersuchungen zeigten, daß der 20 S-Gipfel
DNAase-empfindliches Material enthält. Wurde der 0,4 M
KCl-Extrakt der dRNP-Partikel vor der Zentrifugation im
Dichtegradienten mit DNAase inkubiert, so trat der 20 S-
Gipfel nicht mehr auf, jedoch zusätzlich eine Schulter

im oberen Teil des Gradienten (Abb. 23 b). Der Frage, ob dieser Nukleoproteinkomplex ein integrierter Bestandteil der dRNP-Partikel ist oder kosedimentierendes Chromatin darstellt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht weiter nachgegangen werden. Eine Klärung wird späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

DISKUSSION

Der Weg der Informations-RNS (dRNS im Kern, pre-mRNS und mRNS im Cytoplasma) war und ist Ziel einer großen Zahl von Untersuchungen. Die wichtigsten Reaktionen bei der Transkription und Translation sind in ihren wesentlichen Punkten geklärt. Über die dazwischenliegende Strecke Weges, d. h. den Transport vom Kern (Chromatin) zu den Polysomen, gibt es jedoch noch wenig sichere und gültige Aussagen. Bekannt ist, daß die RNS dabei immer an Protein gebunden ist, wobei es vermutlich während des Transports, wahrscheinlich an der Kernmembran, zu einem Wechsel der Proteinspezies kommt. Darauf deuten auch neuere Arbeiten (OLSNES, 1971; LEBLEU et al., 1971; LUKANIDIN, GEORGIEV und WILLIAMSON, 1971) über mRNS gebundene Proteine in den Polysomen hin, die zeigen, daß diese Proteine von den Proteinen verschieden sind, mit denen die dRNS im Kern verbunden ist.

Die obligatorische Assoziation von Proteinen mit der mRNS gab schon früh zu der Vermutung Anlaß (SPIRIN, 1969), daß diese Proteine nicht allein die Funktion der Stabilisierung oder des passiven Schutzes der RNS vor enzymatischen Angriffen besitzen, wogegen schon die hohe Empfindlichkeit der dRNPs gegenüber Nukleasen spricht, sondern eine wichtige Funktion bei der Proteinsynthese (Translation) oder beim regulierten Transport der mRNS ins Cytoplasma ausüben.

Eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis dieser Vorgänge war eine Kenntnis der an RNS gebundenen Proteine oder Typen von Proteinen oder von Proteinen, die aufgrund ihrer Affinität zu RNS Komplexe mit dieser zu bilden ("RNS-bindende Proteine") vermögen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der erste der beiden Punkte behandelt und zwar wurden Proteine der "Kern-informosomen" untersucht, da diese Strukturen wohl eine letzte Vorstufe der Informations-RNS im Kern vor dem Transport ins Cytoplasma darstellen. So nehmen etwa SCHERRER und MARCAUD (1968) in der von ihnen postulierten "Kaskaden-Regulation" an, daß die Regulation der Genexpression in der tierischen Zelle in einem vielstufigen Prozess erfolgt, der drei Grundstufen des zellulären Informationstransports einschließt; a) im Kern die Synthese von Riesenvorläufermolekülen (pre-mRNS) für die messenger RNS (mRNS), b) das Processing der pre-mRNS, das schließlich zu Entstehung der mRNS führt, die ins Cytoplasma transportiert wird, c) die Translation der mRNS in das Protein.

Die Vorstellung, daß die dRNP-Partikel des Zellkerns die letzte Vorstufe vor dem Transport der Informations-RNS ins Cytoplasma sein könnten, wird durch die Tatsache gestützt, daß in den 30 S-dRNP-Partikeln des Kerns Nukleasen (Endonukleasen) gefunden wurden, die hochmolekulare DNS-ähnliche RNS definiert in stabile DNS-ähnliche RNS oder cytoplasmatische mRNS zu spalten vermögen (NIESSING und SEKERIS, 1970).

Ein weiterer Grund, dRNP-Partikel aus Zellkernen zur Isolierung ihrer Proteine auszuwählen, war, daß diese Partikel bereits gut definiert und leicht zu isolieren sind. Ihr Proteinanteil ist ebenfalls von verschiedenen Autoren untersucht worden. So wurde er z. B. durch Diskelektrophorese bei pH 4,5 charakterisiert. Dabei wurden entweder drei Hauptbanden (SAMARINA, LUKANIDIN, MOLNAR und GEORGIEV, 1968; PARSONS und MCCARTY, 1968; SCHWEIGER und HANNIG, 1968; ISHIKAWA, KURODA und OGATA, 1970; NIESSING und SEKERIS, 1970)

gefunden, oder es wurde nach Reduktion des Proteins nur eine Bande erhalten (KRICHEVSKAYA und GEORGIEV, 1969; SCHWEIGER und HANNIG, 1970; NIESSING und SEKERIS, 1971). Auch bei der Verwendung von basischen Disk-elektrophoresesystemen (SARASIN, 1969; NIESSING und SEKERIS, 1971) ließ sich im wesentlichen nur eine Hauptbande für dieses Protein nachweisen. Durch Vergleich dieses nach seinem elektrophoretischen Verhalten als leicht basisch bis sauer eingestuften Proteins aus drNPs mit ribosomalen Proteinen, Histonen und Kernsaftproteinen (GEORGIEV et al., 1968; SARASIN, 1969; PARSONS und McCARTY, 1968; OGATA et al., 1970) konnte gezeigt werden, daß es ein von diesen Proteinen ganz unterschiedliches Bandenmuster besitzt. Ebenso bestätigte die Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils der 30 S-Partikel aus Kernen, daß es sich hier um eine eigene Gruppe von Proteinen handeln muß (KRICHEVSKAYA und GEORGIEV, 1969; SARASIN, 1969). Dem einfachen Bandenmuster bei pH 4,5 stehen jedoch Befunde gegenüber, die dann erhalten wurden, wenn die Disk-elektrophorese der drNP-Proteine in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat ausgeführt wurde (NIESSING und SEKERIS, 1971). Nach dem Bandenmuster auf den SDS-Gelen erscheint es so, daß die Partikel eine beträchtliche Anzahl (etwa 10 - 15) von Proteinen enthalten. Auf der anderen Seite gibt es Befunde von KRICHEVSKAYA und GEORGIEV (1969) nach dem Bandenmuster bei pH 4,5 und zusätzlichen Hinweisen, nach denen diese Autoren annehmen, daß sich der Proteinanteil der 30 S-Partikel aus 15 - 20 identischen Proteinuntereinheiten mit einem Molekulargewicht von 40000 - 45000 zusammensetzt. Diese sich widersprechenden Befunde sind schwierig zu interpretieren und lassen nach KRICHEVSKAYA und GEORGIEV eine einfache Struktur nach dem SDS-Bandenmuster

(NIESSING und SEKERIS) einen sehr komplizierten Aufbau der dRNP-Partikel erwarten.

Zur Trennung der Proteine der 30 S-Partikel aus Kernen der Rattenleber wurden in dieser Arbeit zwei Verfahren durchgeführt.

1) Dissoziation mit Harnstoff

In Anlehnung an frühere Arbeiten von SCHWEIGER und HANNIG (1968 und 1970) wurde der größte Teil der an die dRNP-Partikel durch salzartige oder Wasserstoffbrücken-Bindungen assoziierten Proteine in Gegenwart von Harnstoff, im vorliegenden Fall von 5 M Harnstoff, abgelöst und von der RNS und einem RNS-Protein-Restkomplex getrennt. Dabei wurde das Verfahren der trägerfreien Elektrophorese angewendet, das sich schon früher bei der Trennung der Komponenten von RNS-Protein-Komplexen als schnell und leicht durchzuführendes Verfahren erwiesen hatte. Von SARKAR (1967) waren zuerst Bedingungen untersucht worden, die es gestatteten die Protein- von der RNS-Komponente verschiedener Stämme des TMV-Virus in präparativem Maßstab abzutrennen, wobei die Eigenschaft dieser Partikel im Basischen zu zerfallen durch die Anwendung eines Puffersystems bei pH 10,5 ausgenutzt werden konnte. Anders als bei den TMV-Viren erfolgt die Dissoziation der dRNP-Partikel aus Kernen nur in Anwesenheit hoher Harnstoffkonzentrationen oder bei hohen Ionenstärken. Außerdem ist es erforderlich, wegen der Tendenz der RNS und des Proteins wieder zu aggregieren, diese Bedingungen bis zur völligen Trennung der Komponenten aufrecht zu erhalten. Da hohe Harnstoffkonzentrationen die Trennschärfe in der trägerfreien Elektrophorese nicht negativ beeinflussen, erwies sie sich als geeignetes Verfahren für diese Problemstellung. Auf diese Weise gelang es SCHWEIGER und HANNIG

(1968) zuerst das Protein der 30 S-Kernpartikel ohne eine vorherige enzymatische Verdauung der RNS zu isolieren. Die auch in dieser Arbeit angewandte Methodik, bei der ein Verlust von Partikelkomponenten ausgeschlossen werden kann, brachte eine Trennung der in Harnstoff-Puffer dissoziierten 30 S-Partikel in drei Komponenten unterschiedlicher Beweglichkeit. Das Auftreten einer Komponente mittlerer Beweglichkeit (Rest-RNS-Protein-Komplex), die von SCHWEIGER und HANNIG (1968) nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden konnte, war sicherlich auf die etwas abgeänderte Vorbereitung der Proben für die Trennung in der trägerfreien Elektrophorese zurückzuführen, bei der Verfahren wie Dialysen und Konzentrierung durch Ultrafiltration vermieden wurden.

2) Dissoziation mit hohen Ionenstärken

Als zweites Verfahren zur Isolierung der Proteine wurde die Dissoziation der 30 S-Partikel mit hohen Ionenstärken durchgeführt. Diese Methode wird z. B. zur Isolierung von Chromatinproteinen angewendet. Dabei kommt es in Lösungen hoher Ionenstärken zu einer Dissoziation und gleichzeitigen Lösung der Histone von der DNS und dem Nüthistonprotein. Auch bei den RNS-Protein-Komplexen der Ribosomen führen Lösungen hoher Ionenstärken zur Abtrennung einer Anzahl von basischen und sauren Proteinen von einem als "core" bezeichneten RNS-Protein-Restkomplex.

Mit diesen beiden Isolierungsverfahren gelang es zwei Proteinkomponenten der 30 S-dRNP-Partikel mit unterschiedlichen Molekulargewichten anzureichern, von denen das mit Harnstoff lösliche mit ca. 70 % am Gesamtprotein der 30 S-Partikel beteiligt ist. Diese Versuche ergaben somit eine Bestätigung für die Anwesenheit eines sogenannten Hauptproteins, wie es von verschiedenen anderen

Autoren ebenfalls angenommen wird (KRICHEVSKAYA und GEORGIEV, 1969; SARASIN, 1969; MATRINGE und JACOB, 1972). Aufgrund seines mit der SDS-Methode bestimmten Molekulargewichts von 42000 zählt es zu den Komponenten mit relativ niedrigem Molekulargewicht in den Partikeln.

Wegen der Wichtigkeit für die Funktion und Struktur der dRNP-Partikel wurde die Frage nach dem Vorkommen der Komponenten mit hohem Molekulargewicht eingehend untersucht. Nach meiner Ansicht sind zumindest ein Teil der Banden mit hohem Molekulargewicht auf den SDS-Gelen als Artefakte anzusehen. Folgende Hinweise wurden dafür erbracht:

- 1) Werden dRNP-Partikel in Anwesenheit hoher Ionenstärken dissoziiert, so ist eine vermehrte Umwandlung in Komponenten mit hohem Molekulargewicht zu verzeichnen. Diese scheinen sehr stabile Formen zu sein und lassen sich, wie durch Dichtegradientenzentrifugation gezeigt wurde, teilweise ohne niedermolekulares Hauptprotein anreichern. Dieser Umstand schließt eine denkbare Interaktion des Detergens Natriumdodecylsulfat mit dem Protein bei der Bildung der hochmolekularen Komponente aus.
- 2) Eine Verringerung oder ein fast völliges Fehlen der Komponenten mit hohem Molekulargewicht tritt ein, wenn die dRNP-Partikel mit Tris-Phosphat-Harnstoff-Puffer behandelt werden. Da es sich bei diesen Versuchen jeweils um Partikel derselben Präparation handelte, kann für dieses Phänomen nicht eine unterschiedliche Reinheit der dRNPs verantwortlich gemacht werden. Auch der mögliche Einwand, die hochmolekularen Komponenten wären aus dem Tris-Phosphat-Harnstoff-Puffer schlecht oder gar nicht ausfällbar, kann deshalb ausgeschlossen

werden, da bei Verwendung von Harnstoff-Puffern, die kein Phosphat enthalten, ebenfalls hochmolekulare Komponenten auf den SDS-Gelen gefunden werden.

Die Möglichkeit, daß das SDS-Bandenmuster nicht die tatsächliche Proteinzusammensetzung der Partikel wiedergeben könnte, wurde auch von NIESSING und SEKERIS (1969) nicht ausgeschlossen. Es konnte nämlich von ihnen gezeigt werden, daß einige Komponenten mit sehr hohem Molekulargewicht von 165000 - 400000 auf den SDS-Gelen nach der Oxidation des Proteins mit Perameisensäure nicht mehr auftraten und die deshalb als mögliche Aggregatformen angesehen wurden. Die vorliegenden Untersuchungen ergaben darüber hinaus, daß im wesentlichen alle der Proteinbanden auf den SDS-Gelen mit niedrigerer elektrophoretischer Beweglichkeit als das Hauptprotein mit 42000 als Artefakte anzusehen werden müssen, die sich in vitro ausbilden. Ob nur eine bestimmte Komponente der niedermolekularen Hauptproteine oder alle in gleichem Ausmaß an der Bildung der hochmolekularen Komponenten beteiligt sind, ließ sich nicht eindeutig feststellen. Es müssen aber bestimmte Bindungsorte bei der Aggregation bevorzugt sein, da es im wesentlichen immer zu einem ähnlichen Bandenmuster der hochmolekularen Komponenten kommt. Es ist jedoch schwierig für diesen Mechanismus, der zu der Bildung von Banden mit offensichtlich hohem Molekulargewicht führt, eine befriedigende Erklärung zu finden. Wie schon früher von GEORGIEV und KRICHEVSKAYA (1969) und auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, rührt dieses Phänomen nicht von extrem stabilen Disulfid-Bindungen her, außer vielleicht im Falle einiger schwächerer Banden ziemlich langsamer Beweglichkeit. Wahrscheinlicher hat die Umwandlung der Proteine mit niedrigem Molekulargewicht vornehmlich ihren Grund in dem Fehlen von anorganischem Phosphat während der Dissoziation der dRNP-Partikel, bei der Harnstoff oder Salze wie NaCl oder KCl gebraucht werden. Das deutet

andererseits darauf hin, daß Phosphat bei einer Konzentration von 0,01 M einen stabilisierenden Einfluß auf die Proteine der dRNPs ausübt. Man könnte sich vorstellen, daß das Phosphat in diesem Fall die RNS ersetzen könnte, die abdissoziiert oder von den Bindungsstellen des Proteins entfernt wird, und so verhindert, daß die Proteine Veränderungen, etwa Konformationsänderungen eingehen oder spezifisch untereinander reagieren. Neueste Befunde (GALLINARO-MATRINCE und JACOB, 1973) haben ergeben, daß die Hauptproteinkomponente der dRNP-Partikel aus Kernen des Rattenhirns festgebundenes Phosphat enthält. Phosphor-Proteine sind aber, wie z. B. aus einem Bericht von PLATZ, KISH und Kleinshmith (1970) hervorgeht, teilweise instabil. Es käme also auch die Möglichkeit in Betracht, daß das Auftreten hochmolekularer Komponenten mit dem Vorkommen instabiler Phosphorproteine zusammenhängt.

In diesem Zusammenhang scheint es auch wichtig zu erwähnen, daß die Präparation der 30 S-Partikel etwas von dem von SAMARINA, KRICHEVSKAYA und GEORGIEV (1966) angegebenen Verfahren abweicht. Die hier unmittelbar nach der Extraktion durchgeführte Sedimentation der dRNP-Partikel, die dadurch von mitextrahierten löslichen Enzymen - zu denken ist dabei an Nukleasen, Proteasen und vielleicht Kinasen - getrennt werden, scheint einen stabilisierenden Einfluß auf die Proteine auszuüben und könnte andererseits für das Vorkommen von chromatinähnlichem Material verantwortlich sein.

Nach meinen Befunden müssen drei Proteine, die bei Benutzung des Harnstoff-Tris-Phosphat-Puffers auf den SDS-Gelen als unterschiedliche Banden wandern, als echte Proteinbestandteile der dRNP-Partikel angesehen werden, da sie in allen analysierten Präparationen ein reproduzierbares Muster bilden. Ihre Molekulargewichte von 42000,

32000 und 25000 erwiesen sich als relativ niedrig und von ähnlicher Größe, was dafür spricht, daß diese Proteine in der Tat in der Polyacrylamid-Diskelektrophorese bei pH 4,5 als eine Bande wandern können.

2 - 3 sehr schwach angefärbte Banden, die noch zusätzlich unter den Hauptproteinen gefunden wurden, können Spuren von Histonen zugeschrieben werden. Es sollte jedoch an dieser Stelle betont werden, daß diese Befunde nicht die Anwesenheit von Enzymproteinen (NIESSING und SEKERIS, 1970 und 1972), die mit den dRNP-Partikeln assoziiert sind, ausschließen. Da diese Enzyme in sehr niedriger Konzentration zu erwarten sind, können sie nur schwer mit den Polyacrylamid-Diskelektrophorese-Techniken, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, nachgewiesen werden.

Das Verhalten des Hauptproteins mit 42000, in der SDS-Diskelektrophorese als eine etwas breite Zone mit einem Übergewicht des vorauslaufenden Randes zu wandern, deutet auf eine gewisse Heterogenität innerhalb dieser Komponente hin, wie es von MATRINGE und JACOB (1972) für das niedermolekulare Hauptprotein der dRNP-Partikel aus Rattenhirnkernen angenommen wird. In der Diskelektrophorese bei pH 4,5, wo das Hauptprotein mit drei Banden auftritt, scheint es jedoch je nach Bedingungen (vorherige Reduktion des Proteins) in eine Bande umwandelbar. Andererseits zeigt das Ergebnis, das nach der Fokussierung des gereinigten Materials erhalten wurde, daß sich das Hauptprotein der dRNP-Partikel aus 5 - 6 Spezies mit etwas unterschiedlichen isoelektrischen Punkten zusammensetzt, die zwischen pH 6,9 und 7,8 liegen und der elektrophoretischen Beweglichkeit in der trägerfreien Elektrophorese entsprechen (Aufgrund ihres elektrophoretischen Verhaltens in der Diskelektrophorese wurde von SARASIN (1969) der isoelektrische Punkt der 30 S-Partikel-Proteine

mit pH 6,5 - 7,0 angegeben). Der ziemlich gleichmäßige Zwischenraum der isoelektrischen Punkte in Abständen von 0,2 - 0,25 pH-Einheiten könnte das Anzeichen für eine gewisse parallele strukturelle oder funktionelle Erscheinung dieser Spezies sein. Die bei der Fokussierung auftretende Mikroheterogenität besagt aber nicht, daß es sich um unterschiedliche Proteine handeln muß, da eine Reihe von Proteinen, die nach herkömmlichen Charakterisierungsmethoden als einheitlich angesehen werden, ein ähnliches Verhalten zeigen. Nach einem kürzlich erschienenen Bericht von BILLINGS und MARTIN (1973), wo von nur zwei Proteinkomponenten in den dRNPs gesprochen wird, ist eher mit einer begrenzten Zahl von Proteinen in diesen Strukturen zu rechnen.

Neben der Untersuchung des Proteinanteils der 30 S-Partikel aus Rattenleber wurde in dieser Arbeit auch ein Vergleich der mit Harnstoff löslichen Proteinkomponente aus Kernpartikeln anderer Organe und Tierspezies durchgeführt. Bei den hier verwendeten 30 S-dRNP-Partikeln aus Kernen der Rattenniere, Maus- und Meerschweinchenleber ließ sich durch trägerfreie Elektrophorese in etwa gleicher Menge, wie bei der Rattenleber eine Proteinkomponente mit geringer elektrophoretischer Beweglichkeit abtrennen. Ihre diskelektrophoretische Untersuchung ergab, daß diese Proteine in Gegenwart von SDS ebenfalls mit einer etwas breiten Bande mit Molekulargewicht 42000 wandern und durch Diskelektrophorese bei pH 4,5 in die drei für das Informosomenprotein charakteristischen Banden aufgetrennt werden. Bei der Fokussierung dieser Proteine ist wie beim Hauptprotein aus Rattenleber eine Auftrennung in 4 - 5 Spezies mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten im Bereich pH 6,9 - 7,8 zu verzeichnen. Die hinsichtlich der Isolierbarkeit und der Eigenschaften dieser Proteinkomponenten übereinstimmenden

Befunde können als Bestätigung des Vorkommens solcher Proteine in den untersuchten Organen und Tierspezies gewertet werden und lassen darüber hinaus auf ein allgemeines Vorliegen dieser Proteine in Kernpartikeln schließen.

Die Methode, die dRNP-Strukturen durch hohe Ionenstärken (0,4 M KCl) teilweise zu dissoziieren, führte ebenfalls zu interessanten Befunden. Ein Teil der Proteine wird dabei von den dRNP-Partikeln abgelöst. Wie sich in der SDS-Diskelektrophorese nach teilweiser Reinigung dieses Materials durch Dichtegradientenzentrifugation zeigte, lag in diesem Fall neben geringen Mengen der Komponente mit Molekulargewicht 32000 und Spuren von Histonbanden hauptsächlich die Komponente mit Molekulargewicht 25000 vor. Dieses Protein erwies sich in dem angegebenen RNS-Bindungstest (GIRARD und BALTIMORE, 1966) als hoch aktiv durch seine Affinität zu RNS, im durchgeführten Test zu homologer d. h. markierter RNS (dRNS) aus Kernen. Durch die Möglichkeit Proteine in nichtdenaturierter Form zu erhalten, wie die Aktivität des Proteins RNS zu binden beweist, zeigte sich der große Vorzug dieser Methode gegenüber dem Verfahren die Proteine mit Harnstoff zu isolieren, das zwangsläufig zur Denaturierung der Proteine führt und weitergehende funktionelle Untersuchungen an den Proteinen unmöglich macht. Wegen der Anwesenheit chromatin-ähnlichen Desoxyribonukleoproteins in den dRNP-Partikelpräparationen konnte jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden, daß die Bindungsaktivität geringen Mengen von Histonen zuzuschreiben ist, die mit RNS eine starke Bindung eingehen. Dafür käme in diesem Fall das lysinreiche Histon F1 in Frage, das sich bei einer Ionenstärke von 0,4 - 0,5 M (MARUSHIGE und BONNER, 1966) ablöst. Durch eine Behandlung der Proben vor dem RNS-Bindungstest mit CM-Cellulose,

einem Austauscher, der bekanntlich zur völligen Entfernung von Histonen benutzt wird, konnte der eindeutige Beweis erbracht werden, daß die RNS-Bindung nicht durch vorhandene Spuren von Histonen vorgetäuscht wird.

Die in geringer Menge als Verunreinigung mit der RNS-Bindungskomponente aufgefundenen Histone, stammen aus einem bei der Extraktion der 30 S-Partikel mit 0,4 M KCl noch zusätzlich aufgetretenen chromatinähnlichen Material. So wurden in dieser mit etwa 20 S sedimentierenden Komponente Histone und Empfindlichkeit gegenüber DNAase gefunden. Die Frage, ob diese als Desoxyribonukleoprotein identifizierte Komponente ein integrierter Bestandteil der dRNP-Partikel ist oder lösliches Material darstellt, das mit den dRNP-Partikeln zusammen sedimentiert, konnte nicht geklärt werden und wird späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Von den eindeutig als echt angesehenen Proteinkomponenten konnten zwei in größerer Reinheit isoliert werden: Mit Harnstoff das Protein mit 42000 und ohne Harnstoff das Protein mit 25000. Diese beiden Proteine lassen sich aufgrund ihrer Löslichkeitseigenschaften und ihres Molekulargewichtsklar voneinander unterscheiden. Die Aminosäureanalysen, die jeweils mit den reinsten Präparationen dieser Proteine durchgeführt wurden, ergaben jedoch eine weitgehende Übereinstimmung der Aminosäurewerte, was dafür spricht, daß diese Proteine einander sehr verwandt sind. Besonders auffallend ist beim Hauptprotein mit 42000 der sehr hohe Glycingehalt von annähernd 26 Mol %, der sicher nicht durch die Anwesenheit von Nukleinsäuren verursacht ist, wie aus der elektrophoretischen Beweglichkeit bei pH 8,2 in der trägerfreien Elektrophorese und den Absorptionseigenschaften geschlossen werden kann. Dagegen ist der Glycinwert von 19 Mol % für das Protein mit 25000 wegen der Anwesenheit von Nukleinsäuren eher

etwas niedriger anzusetzen. Da sich bei den mit Harnstoff löslichen Hauptproteinen aus anderen Organen und Tierspezies ebenfalls Glycinwerte von durchschnittlich 24 Mol % nachweisen ließen, muß man annehmen, daß in dieser Proteinkomponente fast jede vierte Aminosäure als Glycin vorliegt. Außer den sehr hohen Glycinwerten, waren die gefundenen Aminosäurezusammensetzungen früheren Daten vergleichbar, die für das Gesamtprotein (KRICHEVSKAYA und GEORGIEV, 1969; SARASIN, 1969; ISHIKAWA, KURUDA und OGATA, 1970) angegeben wurden.

Bei der Endgruppenbestimmung des Hauptproteins mit 42000 wurde Threonin als einzige N-terminale Aminosäure gefunden. Danach sollte nur ein Protein in der Gruppe von 42000 vorliegen. Es bleibt jedoch abzuwarten, ob und in wie weit dieses Protein noch heterogen ist, wie es von MATRINGE und JACOB (1972) angenommen wird. Die bei der Fokussierung des Hauptproteins auftretende Mikroheterogenität deutet jedenfalls auf eine solche Möglichkeit hin.

Die Verfahren, mit denen die Isolierung zweier Proteine der 30 S-Partikel gelang, gaben auch Hinweise dafür, daß zwischen der RNS und den Proteinen in den Partikeln eine unterschiedliche Bindungsfestigkeit bestehen muß. Nach den Löslichkeitseigenschaften können drei Gruppen von Proteinen unterschieden werden:

- 1) In 0,4 M KCl lösliche Proteine, zu denen das Protein mit 25000 und das Desoxyribonukleoprotein gehören.
- 2) In Harnstoff lösliche Proteine, zu denen die Hauptproteinkomponente mit 42000 zählt.
- 3) In Harnstoff unlösliche Proteine. Dazu sind die Proteine zu rechnen, die in Anwesenheit von 5 M Harnstoff noch einen Rest-RNS-Proteinkomplex bilden, der sich durch trägerfreie Elektrophorese von der freien RNS und dem Hauptprotein trennen läßt.

Die verschiedenen Löslichkeitseigenschaften dieser Proteinkomponenten lassen eine abgestufte Bindungsfestigkeit zur RNS erkennen, in der sich funktionelle Eigenschaften dieser Proteine ausdrücken könnten. Man könnte sich vorstellen, daß in vivo ebenfalls eine Gruppe von Proteinen abgelöst wird, z. B. das Hauptprotein, und bei dem vermuteten Austausch von Proteinen während des Transports der Informations-RNS ins Cytoplasma durch andere Proteinkomponenten ersetzt wird.

MATERIAL UND METHODEN

Allgemeines:

Organische und anorganische Chemikalien wurden, soweit nicht besonders angeführt, von der Fa. Merck, Darmstadt, in analysenreiner Qualität bezogen.

Zur Herstellung der Lösungen wurde glas-destilliertes Wasser verwendet.

Alle Isolierungsschritte wurden bei $0 - 4^{\circ} \text{C}$ ausgeführt.

1) Tierisches Material

Die vorliegende Arbeit wurde mit folgenden Tierspezies durchgeführt:

- a) Albino-Ratten der Stämme Wistar oder Sprague-Dawley mit einem Gewicht von 200 - 230 g. Von 10 Ratten konnten 60 - 70 g Leber oder 20 - 25 g Niere gewonnen werden. Es konnten keine Unterschiede zwischen Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten bzw. männlichen oder weiblichen Tieren bei der Präparation der dRNP-Partikel und deren Menge und Proteinzusammensetzung festgestellt werden.
- b) Albino-Mäuse vom Stamm NMRI mit einem Gewicht von 25 - 30 g. Das Gewicht der Lebern lag bei 1,0 - 1,2 g. Pro Versuch wurde mit 40 Tieren gearbeitet.
- c) Albino-Meerschweinchen mit einem Gewicht von 350 - 400 g. Das Gewicht der Lebern lag bei 12 - 14 g. Pro Versuch waren 4 - 5 Tiere nötig.
Ein Hungern der Tiere vor den Versuchen war nicht erforderlich.

Die einzelnen Schritte zur Isolierung der dRNP-Partikel aus Kernen waren an der Rattenleber erarbeitet worden und ließen sich ohne Veränderungen auf die anderen oben genannten Gewebe übertragen. Die Beschreibung, die am Beispiel der Rattenleber gegeben wird, gilt somit auch für die anderen untersuchten Gewebe.

2) Präparation von Zellkernen aus Rattenleber, Ratten-
niere, Maus- und Meerschweinchenleber

Lit.: CHAUVEAU, MOULE und ROUILLER (1956)

POGO, ALLFREY und MIRSKY (1966)

Gewebepresse (Harvard App., Co. Inc., Millis, Mass.)
aus rostfreiem Stahl

Homogenisator Typ Potter-Elvehjem (Thomas, Phila-
delphia), 60 ml, Teflonpistill, weiter
Spalt

Braun-Mixer (Fa. Braun AG, Frankfurt/M., Typ MX 32 Z)

Lösungen:

Isotonische Homogenisierungslösung: 0,32 M Saccharose,
3 mM $MgCl_2$

Reinigungsmedium: 2,4 M Saccharose,
1 mM $MgCl_2$

Isotonische Resuspensionslösung: 0,32 M Saccharose,
3 mM $MgCl_2$
(Saccharose frei von
Ribonuclease, Mann,
New York, USA)

Für eine Aufarbeitung wurden gewöhnlich 10 Wistar- oder
Sprague-Dawley-Ratten verwendet.

Sofort nach Töten der Tiere durch Genickschlag wurden
die Lebern entnommen und in eiskalte Homogenisierungslösung
gelegt. Die Organe wurden von anhaftendem Bindegewebe befreit,
3 - 4 mal mit der Homogenisierungslösung gewaschen, mit der
Gewebepresse zu einem Gewebebrei zerkleinert und mit 9 Volumina
der Homogenisierungslösung vermischt.

Diese Gewebesuspension wurde in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator mit weit eingeschliffenem Pistill durch 8 Auf- und Abbewegungen bei langsamer mechanischer Drehung des Pistills homogenisiert. In einigen Versuchen wurden die gewaschenen Lebern direkt im Braunmischer homogenisiert, wobei 6 mal je 8 Sekunden die niedrigste Drehzahlstufe eingeschaltet wurde. Diese weniger zeitraubende Methode verringerte die Ausbeute an Zellkernen um etwa 20 % gegenüber der zuerst genannten.

Zur Entfernung größerer Gewebefetzen wurde das Homogenat durch 6 Lagen Verbandmull filtriert. Das Filtrat wurde 10 min bei 700 x g zentrifugiert. Das Sediment, das neben den Zellkernen Zellbruchstücke, ganze Zellen und Erythrocyten enthält, wurde mit 3 Volumina des Reinigungsmediums verrührt und im Rotor 30 der Spinco Ultrazentrifuge L 2-50 B (Beckman Instruments) 70 min bei 25000 UpM zentrifugiert. Die Zellkerne sedimentierten hierbei aufgrund ihrer höheren Dichte, während die Masse der Homogenatbestandteile einschließlich der Erythrocyten nach oben steigen (flotieren).

Das meist schwach rosa gefärbte Kernsediment wurde einmal mit der Resuspensionslösung gewaschen.

Aus 60 - 70 g Leber konnten im Durchschnitt 4,5 - 5 g (Naßgewicht) Zellkerne gewonnen werden.

Aus anderen Geweben wurden ähnliche Ausbeuten an Zellkernen erzielt.

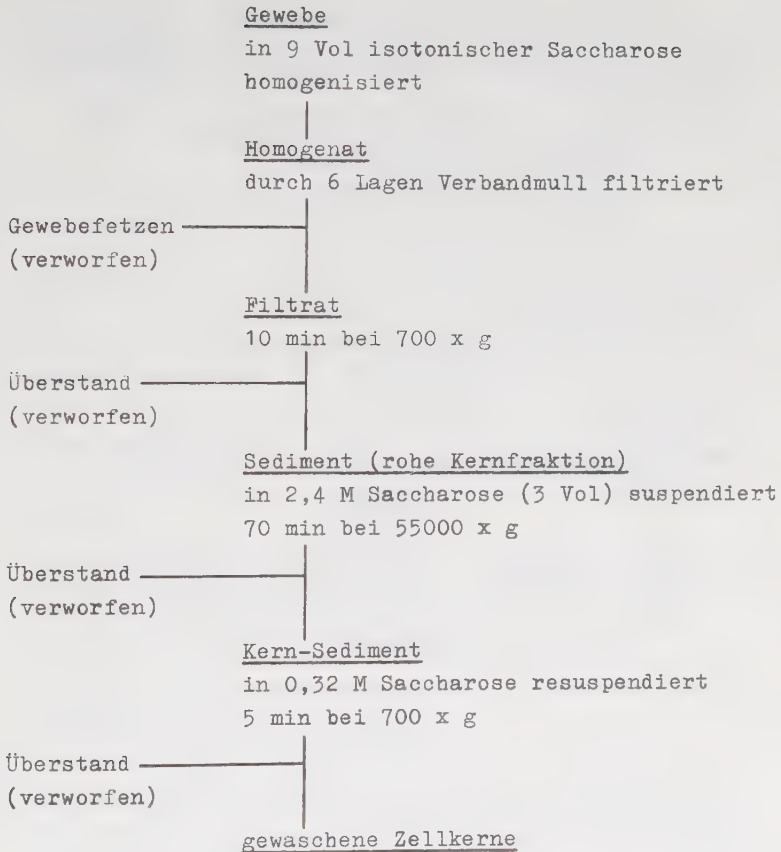


Abb. 26 Präparationsschema zur Isolierung von Kernen
aus Rattenleber, -niere, Maus- und Meerschwein-
chenleber.

3) Präparation von 30 S-dRNP-Partikeln aus Kernen der Rattenleber bzw. Rattennierniere, Maus- und Meerschweinchenleber

Lit.: SAMARINA, KRICHEVSKAYA und GEORGIEV (1966)
SCHWEIGER und HANNIG (1968)
PARSONS und McCARTY (1968)

Homogenisator nach Dounce

Gradientenmischgerät

Gradientenfraktioniergerät

Lösungen:

STM-Puffer pH 7.0 0,14 M NaCl, 1 mM $MgCl_2$,
10 mM Tris mit HCl auf pH 7.0
eingestellt

STM-Puffer pH 8.0 0,14 M NaCl, 1 mM $MgCl_2$,
10 mM Tris mit HCl auf pH 8.0
eingestellt

"Cushion"-Lösung 0,5 M Saccharose (ultrarein,
Mann, New York, USA) in STM-
Puffer pH 8.0

Gradientenlösungen: 15 % Saccharose (ultrarein) in
STM-Puffer pH 8.0

30 % Saccharose (ultrarein) in
STM-Puffer pH 8.0

a) Extraktion der Zellkerne

Die Zellkerne (4 - 5 g, Naßgewicht) wurden einmal (10 min) mit 30 ml STM-Puffer pH 7.0 und danach zweimal (15 min) mit insgesamt 40 ml STM-Puffer pH 8.0 extrahiert. Alle drei Extraktionen wurden unter Rühren im Eisbad ausgeführt. Die beiden

Extrakte mit STM-Puffer pH 8.0 wurden vereinigt und im Rotor SS-34 der Sorvall-Zentrifuge bei 15000 UpM 20 min zentrifugiert. Das hierbei erhaltene kleine Sediment wurde verworfen, aus dem Überstand wurden die RNP-Partikel isoliert.

b) Hochtourige Zentrifugation des Kernextrakts

Je 8.0 ml des Überstands der letzten Zentrifugation wurden in Cellulosenitrat-Röhrchen des Rotors 50 der Spinco-Zentrifuge gefüllt und mittels einer Spritze mit 2,0 ml Cushionlösung unterschichtet. Bei der folgenden Zentrifugation für 2,5 h bei 50000 UpM sedimentierten die RNP-Partikel, während Proteine und niedermolekulare Substanzen im Überstand blieben, z. T. an der Dichtebarrriere des cushions.

Die Sedimente wurden vorsichtig mit einem Glasstab von der Wand der Röhrchen abgelöst, und die RNP-Partikel in insgesamt 4 ml STM-Puffer pH 8.0 mit Hilfe eines kleinen Dounce-Homogenisators wieder in Lösung gebracht.

c) Dichtegradientenzentrifugation

In Röhrchen des Rotors SW 25,1 der Spinco-Zentrifuge wurden lineare 15 - 30 %ige Saccharosegradienten in STM-Puffer pH 8.0 gemischt, auf die je 2 ml der zu trennenden Probe aufgetragen wurden. Die Gradienten wurden 14 h bei 23000 UpM zentrifugiert und anschließend in Fraktionen von 1 ml fraktioniert. Die Extinktion bei 235, 260 und 280 nm wurde im Spektralphotometer PMQ 2 (Zeiss, Oberkochen) gemessen.

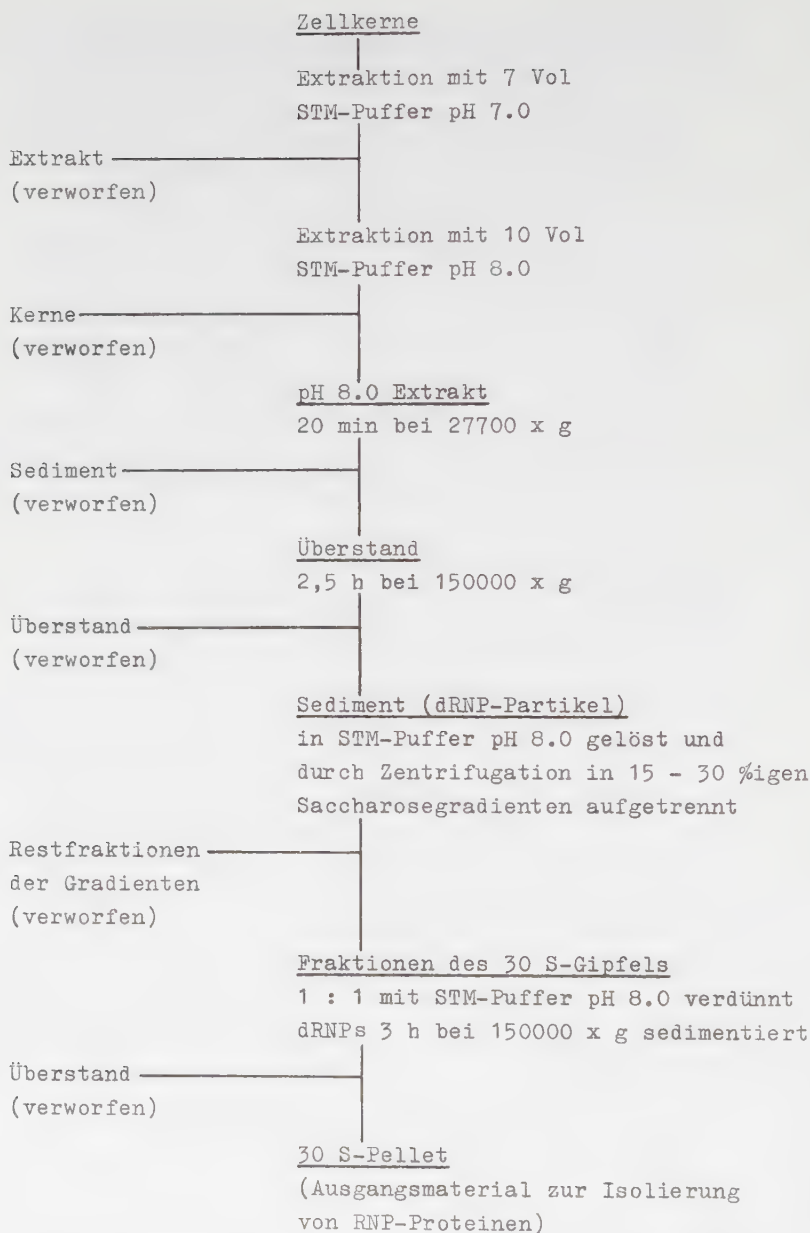


Abb. 27 Präparationsschema zur Isolierung von dRNP-Partikeln aus Zellkernen

d) Konzentrierung der 30 S-Partikel aus Fraktionen des Dichtegradienten

Entsprechende Fraktionen (12 - 17) wurden gepoolt, im Verhältnis 1 : 1 mit STM-Puffer pH 8.0 verdünnt und 3 h im Rotor 50 bei 50000 UpM zentrifugiert. Die hierbei erhaltenen Pellets der dRNP-Partikel waren das Ausgangsmaterial bei der Isolierung der Partikel-Proteine.

Die Aufarbeitung bis zur Isolierung der rohen dRNP-Fraktion wurde zusammenhängend ausgeführt. Nach der hochoptimierten Zentrifugation des STM pH 8.0-Extraktes kann die Aufarbeitung unterbrochen werden; das Einfrieren der Pellets bei -20°C war ohne sichtbaren Einfluß auf die Proteinzusammensetzung der Partikel.

4) Präparative Trennung von RNS und Protein der
30 S-Partikel durch trägerfreie Elektrophorese

Lit.: HANNIG (1964)

Die Trennung wurde in einer kontinuierlich und trägerfrei arbeitenden Ablenkungselektrophorese-Apparatur nach Hannig (Modell VAP II, Fa. Bender & Hobein GmbH, München) durchgeführt.

Technische Daten der Trennkammer:

Breite der Trennkammer: 50 cm

Länge der Trennkammer: 43 cm

Fraktionierung in 96 Fraktionen

Bei der Trennung herrschende Bedingungen

Kammerpuffer: 5 M Harnstoff, 0,01 M Tris mit gesättigter KH_2PO_4 -Lösung auf pH 8,2 eingestellt, Leitfähigkeit $10,1 \times 10^2 \mu\text{S}$

Elektrodenpuffer: 0,15 M Tris, mit gesättigter KH_2PO_4 -Lösung auf pH 8,2 eingestellt, Leitfähigkeit $10,5 \times 10^3 \mu\text{S}$

Spannung: 1900 - 1800 V Stromstärke: 100 mA

Pufferdurchsatz: 200 ml/h

Kammertemperatur: 4°C

Pellets der 30 S-Partikel von 10 Rattenlebern (oder entsprechende Mengen aus den anderen Geweben) wurden in 1,6 - 1,8 ml Kammerpuffer gelöst. Die völlig klare, farblose Probe wurde bei Fraktion 57 in die Kammer eingespritzt (Dosierung 2 ml/h). Die nach der Trennung erhaltenen Fraktionen wurden routinemäßig bei 235, 260 und 280 nm gemessen.

5) Behandlung der dRNP-Partikel mit 0,4 M KCl und
Trennung des KCl-Extrakts durch Dichtegradienten-
zentrifugation

Lösungen:

Inkubationspuffer: 0,4 M KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTE
(Dithioerythrit, Serva, Heidelberg),
0,03 M Tris mit HCl auf pH 8,4
eingestellt

Gradientenlösungen: 5 % Saccharose (ultrarein, Mann,
New York, USA) in Inkubationspuffer
20 % Saccharose (ultrarein) in
Inkubationspuffer

Sedimentierte 30 S-Partikel aus den Kernen von 5 Ratten wurden mit Hilfe eines kleinen Dounce-Homogenisators in 1 ml Inkubationspuffer verteilt und über Nacht in Eis gestellt. Danach wurde der nichtgelöste Anteil bei 5000 UpM (15 min) abzentrifugiert. Der Überstand (KCl-Extrakt) wurde auf 5 - 20 %ige Saccharosegradienten gegeben und im Rotor SW 40 der Spinco-Zentrifuge (Beckman Instruments, München) zentrifugiert.

Zur Abtrennung des RNS-bindenden Proteins wurde für 24 h bei 36000 UpM, zur Isolierung des DNAase-empfindlichen Nukleoproteinkomplexes 5,5 h bei 40000 UpM zentrifugiert.

Die Gradienten wurden in Fraktionen von 0,35 ml fraktioniert und diese, nach Verdünnung mit 0,4 ml Inkubationspuffer, bei 235, 260 und 280 nm im Spektralphotometer gemessen.

6) In vivo-Markierung der dRNP-Partikel mit ^{14}C -Orotsäure

Lit.: BRAY (1960)

SCHWEIGER und HANNIG (1968)

Orotsäure -6- ^{14}C (60,8 mC/mM) Radiochemical Centre,
Amersham, England

Bray-Lösung: 60 g Naphtalin

4 g PPO (2,5-Dimethyloxazol)

0,2 g Dimethyl-POPOP (1,4-Bis- [2-(4-methyl-
5-phenyl) oxazol] benzol)

100 ml Methanol

20 ml Äthylenglycol; mit Dioxan auf 1000 ml

Fünf Ratten wurde unter Äthernarkose je 5 μC ^{14}C -Orotsäure in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert.

Nach 40 min wurden die Tiere getötet. Die dRNP-Partikel der Leber wurden isoliert und durch trägerfreie Elektrophorese in Protein- und RNS-Anteil getrennt. Zur besseren Handhabung des Materials wurden nichtmarkierte Partikel von ebenfalls 5 Tieren zugesetzt.

Nach der Trennung wurde jeweils 1 ml der VAP-Fractionen mit 10 ml Bray-Lösung gemischt, und die Radioaktivität in einem Tricarb Scintillation Spectrometer (Packard) gemessen. Identische Ergebnisse wurden gefunden, wenn der säurefällbare Anteil in den Fractionen mit 10 % Trichloressigsäure gefällt und über Cellulosenitrat-Membranen abfiltriert wurde.

7) In vitro Bindung von RNS an isolierte Proteine
der 30 S-Partikel

Lit.: SCHWEIGER und HANNIG (1971)

Cellulosenitrat-Membranfilter Typ 85/1, Porenweite
0,45 μ m, 23 mm Durchmesser (Schleicher & Schüll,
Dassel)

Trägernutsche (aus Teflon, Durchmesser 23 mm)

Szintillationsflüssigkeit: 0,4 % PPO (2,5-Dimethyl-
oxazol), 0,01 % Dimethyl-
POPOP (1,4 Bis- [2-(4-methyl-
5-phenyl)oxazol] benzol) in
Toluol

Inkubationspuffer: 0,03 M Tris mit HCl auf
pH 8,4 eingestellt
0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTE
(Dithioerythrit, Serva, Heidelberg)

[^{14}C] RNS (spez. Aktivität $3.0 - 5.0 \times 10^4$ imp/min und mg),
aus Rattenleberzellkernen nach CONGOTE et al.
(1970) isoliert.

Die RNS-Bindungsaktivität in vitro des KCl-Extrakts
wurde wie folgt durchgeführt:

Je 0,4 ml der Dichtegradientenfraktionen wurde mit
1,2 ml Inkubationspuffer verdünnt, um die Ionenstärke
auf 0,1 M KCl zu senken. Zu den Proben wurden 5 μ l
(entsprechend 5 μ g; ca. 300 - 400 imp/min) der mar-
kierten RNS gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min
bei Eistemperatur wurde der Ansatz über die Cellulose-
nitratmembranen gesaugt. Es wurde mit 2 ml Inkubations-
puffer nachgewaschen, um nichtgebundene RNS zu entfernen.
Die Membranen wurden dann unter einer Infrarotlampe ge-
trocknet und ihre Radioaktivität in 10 ml Zählflüssig-

keit in einem Tricarb Scintillation Spectrometer (Packard) gemessen.

In Kontrollansätzen - ohne Protein - wurde nicht mehr als 2 - 3 % der ursprünglich eingesetzten Radioaktivität auf den Membranen zurückgehalten.

8) DNAase-Behandlung des KCl-Extrakts

Desoxyribonuklease I, aus Rinderpankreas, frei von RNAase, pH Optimum pH 7.0 - 8.0, (Worthington, Biochem. Corporation, Freehold, N.J., USA), gelöst in Inkubationspuffer

Inkubationspuffer: 0,03 M Tris-HCl, pH 8.4, 0,4 M KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTE, 10 mM $MgCl_2$ (Mg^{2+} -Ionen sind für die Aktivität des Enzyms nötig)

Sedimente der dRNP-Partikel wurden in Inkubationspuffer resuspendiert wie auf Seite 85 unter 5) beschrieben. Der Überstand der niedertourigen Zentrifugation wurde geteilt. Zu 0,5 ml der Lösung wurden 50 μ l (50 μ g) der DNAase-Lösung zugesetzt, die andere Hälfte diente als Kontrolle. Nach einer Inkubation für 30 min bei 25° C wurden die beiden Proben auf Saccharose-Gradienten (5 - 20 % in Inkubationspuffer) im Rotor SW 40 der Spinco-Zentrifuge zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bei 40000 UpM für 5,5 h wurden die Gradienten wie üblich fraktioniert und gemessen.

9) Analytische Diskelektrophorese bei pH 4,5

Lit.: ORNSTEIN (1964)

LEBOY, COX und FLAKS (1964)

GEESTELAND und STAHELIN (1967)

Stromgeber mit stabilisiertem Stromfluß

Diskelektrophoresegerät

UV-Lampe

Substanzbedarf 5 - 100 µg Protein

Lösungen für das Trenngel (10 % Acrylamid)

- A) 24 ml 1 N KOH, 8,6 ml Eisessig, 2,0 ml TEMED
(Tetramethyläthylendiamin), 24 g Harnstoff; mit
Wasser auf 50 ml aufgefüllt (pH 4,3)
- B) 6,6 g Acrylamid, 0,1 g Bis (N,N'-Methylenbisacrylamid),
24 g Harnstoff; mit Wasser auf 50 ml
- C) 0,112 mg Ammoniumperoxidisulfat, 4,8 g Harnstoff;
mit Wasser auf 10 ml (Diese Lösung wird jeweils
frisch angesetzt.)
- D) 1 mg $K_3Fe(CN)_6$ in 10 ml Wasser

Lösungen für das Sammelgel (5 % Acrylamid)

- E) 24 ml 1 N KOH, 1,44 ml Eisessig, 0,23 ml TEMED,
24 g Harnstoff; mit Wasser auf 50 ml (pH 6,8)
- F) 2,5 g Acrylamid, 0,63 g Bis, 24 g Harnstoff; mit
Wasser auf 50 ml
- G) 1 mg Riboflavin, 24 g Harnstoff; mit Wasser auf
50 ml
- H) 48 g Harnstoff in 100 ml Wasser

Elektrodenpuffer: 15,6 g β -Alanin, 4,0 ml Eisessig
in 2,5 l Wasser (pH 4,5)

Färbelösung: 90 Teile 20 %iger TCE und 10 Teile
Farblösung (227 ml Methanol, 46 ml
Eisessig, 1,25 g Coomassie Blue
R 250, 227 ml Wasser)

Zur Herstellung des Trenngels wurden 2 ml A, 12 ml B,
2 ml C, und 0,10 ml D gemischt, die Lösung evakuiert
und je 1,5 ml in die Glasröhrchen (5,5 x 100 mm) ge-
füllt.

Über das Trenngel wurde 0,3 ml der Sammelgel-Lösung
gefüllt, die sich aus 1 ml E, 4 ml F, 1 ml G und
2 ml H zusammensetzt.

Pro Gel wurden maximal 0,2 ml der Probelösung aufge-
tragen. Die Elektrophorese wurde ohne Kühlung bei
5 mA/Gel (Anode in der oberen Kammer) durchgeführt
und nach 2 h beendet.

Die Gele wurden aus den Glasröhrchen gelöst und nach
Kuntz (1972) angefärbt. Die Gele wurden mit Wasser
entfärbt, bis der Hintergrund farblos erschien.

10) Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Histonen

Lit.: PANYIM und CHALKLEY (1968)

Histone aus Kalbsthymus, lyophilisiert

Lösungen für das Trenngel (15 % Acrylamid, 6,25 M
Harnstoff)

A) 60 g Acrylamid, 400 mg Bis; mit Wasser auf 100 ml

B) 21,6 ml Eisessig, 2,6 ml TEMED; mit Wasser auf 50 ml

C) 100 mg Ammoniumperoxidisulfat, 30 g Harnstoff; mit
Wasser auf 50 ml

Elektrodenpuffer: 7 g Glycin, 7,6 ml Eisessig in
2,5 l Wasser; pH 3,2

Vorbereitung der Proben:

Fractionen, welche das DNAase-empfindliche Material enthielten, wurden vereinigt und für 30 min mit 0,2 N HCl extrahiert. Der unlösliche Anteil wurde bei 10000 UpM in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden gelöste Proteine mit TCE (Endkonzentration 10 %) gefällt und das Präzipitat, nach Waschen mit 80 % Äthanol in 0,1 ml Elektrodenpuffer aufgelöst, der zusätzlich 8 M Harnstoff enthielt.

2 Teile A, 1 Teil B, 5 Teile C wurden gemischt und 7,5 cm hoch in die Glasröhrchen eingefüllt. Die Gele wurden 4 Stunden bei konstantem Stromfluß von 2 mA/Gel (Anode in der oberen Kammer) vorelektrophoretisiert. Dann wurden die Proben (maximal 0,1 ml) aufgetragen und unter den gleichen Bedingungen 4 Stunden getrennt.

Färbung und Entfärbung der Gele wurden durchgeführt, wie auf Seite 89 unter 9) (Diskelektrophorese bei pH 4,5) beschrieben.

11) SDS-Diskelektrophorese zur Reinheitskontrolle und zur Bestimmung von Molekulargewichten

Lit.: WEBER und OSBORN (1969)

Lösungen für das Trenngel (10 % Acrylamid)

A) Gel-Puffer: 7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 25,67 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g SDS (Serva, Heidelberg);
mit Wasser auf 1000 ml, pH 7.0

B) 22,2 g Acrylamid, 0,6 g Bis; mit Wasser auf 100 ml

C) 50 mg Ammoniumperoxidisulfat in 10 ml Wasser gelöst (frisch angesetzt)

Inkubationslösung: 0,01 M Na-(PO₄)-Puffer, pH 7.0,
1 % SDS, 1 % β -Mercaptoäthanol

Markerlösung: 2 ml Glyzerin, 0,5 ml β -Mercapto-
äthanol, 1 mg Bromphenolblau

Färbelösung: 1,25 g Coomassie Brilliant Blue R 250,
227 ml Methanol, 46 ml Eisessig; mit
Wasser auf 1000 ml

Entfärbelösung: 75 ml Eisessig, 50 ml Methanol,
875 ml Wasser

Die Trenngellösung wurde aus 15 ml A, 13,5 ml B, 1,5 ml C und 0,045 ml TEMED hergestellt, 7,5 cm hoch in Glasröhrchen (5,5 x 100 mm) eingefüllt und mit Wasser überschichtet. Da mit der von WEBER und OSBORN angegebenen Menge an Ammoniumperoxidisulfat die Polymerisation sehr schnell verlief, wurde dessen Konzentration auf 1/3 der ursprünglich angegebenen verringert.

Vorbereitung der Proteinproben

Aus aliquoten Teilen der Fraktionen wurden 5 - 50 μ g mit 10 % Trichloressigsäure gefällt. Nach 20 min wurde das ausgefallene Material bei 4500 UpM (2000 x g) abzentrifugiert und die Trichloressigsäure möglichst vollständig entfernt. Die Sedimente wurden dann in 0,1 ml der Inkubationslösung 2 h bei 37° C inkubiert. Bevor die Probelösung auf das Gel aufgetragen wurde, wurde sie mit einem Tropfen der Markerlösung versetzt.

Als Elektrodenpuffer wurde 1 : 1 verdünnter Gelpuffer verwendet. Die Elektrophorese wurde für 4 h bei

Zimmertemperatur und bei konstantem Stromfluß von 8 mA/Gel (negative Elektrode in der oberen Kammer) durchgeführt.

Nach Beendigung des Laufes wurden die Gelstäbchen eine Stunde in die Färbelösung gelegt und dann entfärbt.

Das Absorptionsprofil der Banden auf den Stäbchen wurde bei 580 nm im Chromoscan-Densitometer (Joyce-Loebl, Gateshead, England) aufgezeichnet.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden folgende Vergleichsproteine verwendet: Serumalbumin MG 68000, Catalase MG 60000, Ovalbumin MG 43000, Aldolase MG 40000, Chymotrypsinogen MG 25700 (Boehringer Protein Calibration Kit; Boehringer, Mannheim); Lactatdehydrogenase MG 36000, Pepsin MG 35000, und Ribonuklease MG 13700 (Serva, Heidelberg). Die relativen Beweglichkeiten der Peptidketten wurden nach Weber und Osborn bestimmt, und die Molekulargewichte mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt.

12) Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgel

Lit.: HAYES und WELLNER (1969)

AWDEH (1969)

Stromgeber für stabilisierte Gleichspannung

Diskelektrophoresegerät

LKB Ampholine pH 3 - 10 (batch 41) LKB, Bromma, Schweden

Substanzbedarf: 20 - 100 µg Protein

Lösungen für das Trenngel (7,5 % Acrylamid)

- A) 15 g Acrylamid, 400 mg Bis, 0,116 ml TEMED,
36 g Harnstoff; mit Wasser auf 100 ml aufge-
füllt
- B) 5 mg Riboflavin, 18 g Harnstoff; mit Wasser auf
50 ml
- C) 40 % Ampholine (w/v) pH 3 - 10
- D) Proteinprobe in 6 M Harnstoff. Das Protein wurde
vor der Fokussierung gegen 6 M Harnstoff dialysiert.

Anodenlösung: 1 % Schwefelsäure

Kathodenlösung: 2,9 % Äthanolamin

Färbelösung: 0,2 % Bromphenolblau, 50 Teile
Äthanol, 45 Teile Wasser, 5 Teile
Eisessig

Entfärbelösung: 30 Teile Äthanol, 65 Teile Wasser,
5 Teile Eisessig

Die Gele wurden folgendermaßen hergestellt:

10 Teile A, 3 Teile B, 1 Teil C und 6 Teile D (pro
Gel 20 - 60 µg Protein) wurden gemischt, 9,5 cm
hoch in die Glasröhrchen (5,5 x 100 mm) eingefüllt
und mit Wasser überschichtet. Die Polymerisation
war nach 20 - 30 min bei normalem Oberlicht beendet.

Vor dem Beginn der Fokussierung wurden die Gele
10 min in der durch Leitungswasser bei 12 - 14° C
geköhlten Elektrophoreseapparatur equilibriert. In
der oberen Kammer befand sich die Anodenlösung und
in der unteren die Kathodenlösung. Dann wurde die
Spannung angelegt und stufenweise bis auf 120 V ge-
steigert. Dabei wurde darauf geachtet, daß die
elektrische Leistung 0,18 W/Gel nicht überschritt.
Nach 10 - 12 h war die Fokussierung beendet. Die

Gele wurden aus den Glasröhrchen gelöst und die Länge gemessen.

Die Gele wurden mit der Färbelösung nach AWDEH für 1 h angefärbt und mit der Entfärbelösung entfärbt.

Zur Ermittlung der isoelektrischen Punkte wurde die Länge der nach der Entfärbung gequollenen Gele gemessen, und die Lage der blaugrün angefärbten Proteinbanden bestimmt.

Einige Gele wurden unmittelbar nach der Fokussierung in 3 mm breite Scheibchen geschnitten, die in je 1 ml Wasser 2 - 3 h eluiert wurden. Anschließend wurde der pH-Wert der Eluate gemessen und der Verlauf des pH-Gradienten graphisch dargestellt.

Aus dem pH-Gradienten und der Lage der angefärbten Proteinbanden konnten unter Berücksichtigung der bei der Anfärbung auftretenden Längenveränderung die isoelektrischen Punkte bestimmt werden. Die Intensität der angefärbten Proteinbanden wurde in einem registrierenden Densitometer (Chromoscan, Joyce-Loebl, Gateshead, England) bei 580 nm aufgezeichnet.

13) Aminosäureanalyse

Lit.: MOORE, SPACKMAN und STEIN (1958)

Apparat: TSM Technicon Autoanalyser

Substanzbedarf: 100 - 150 µg Protein

Die Probe wurde mit 10 %iger Trichloressigsäure gefällt, einmal mit 5 %iger Trichloressigsäure, zweimal mit

70 % Äthanol gewaschen und zuletzt mit Diäthyläther getrocknet. Das Protein wurde mit 1 ml 6 N HCl versetzt, unter Vakuum im Hydrolysekölbchen eingeschmolzen und 22 h bei 110°C hydrolysiert. Die Salzsäure wurde im Rotationsverdampfer entfernt. Das Hydrolysat wurde in Puffer gelöst und geeignete Volumina (20 - 40 µl) auf Säulen für basische und nichtbasische Aminosäuren getrennt.

Die Bestimmung der einzelnen Aminosäureanteile des Proteins erfolgte durch Vergleich mit einem bekannten Aminosäuregemisch.

14) Bestimmung der N-terminalen Aminosäure

Lit.: NEUHOFF, von der HAAR, SCHLIMME und WEISE (1969)
NEUHOFF, WEISE und STERNBACH (1970)

Mikropolyamidplatten beidseitig beschichtet, 3 x 3 cm
(DC-Fertigfolie F 1700 der Fa.
Schleicher & Schüll, Dassel)

Dansylaminosäuren (Serva, Heidelberg)

Dansylierungsmittel: 6 mg Dansylchlorid (Serva) in
1 ml Aceton

0,2 M NaHCO₃/0,2 M Na₂CO₃-Puffer pH 9,0

6 N Salzsäure

Äthylacetat, wassergesättigt (obere Schicht)

50 % Pyridin

Laufmittel:

- I) 1,5 % Ameisensäure
- II) Benzol - Eisessig (9 : 1)
- III) Äthylacetat-Methanol-Eisessig (20 : 1 : 1)

Durchführung der Bestimmung

0,1 - 0,2 nM Protein wurde in 15 μ l 0,2 M NaHCO_3 /0,2 M Na_2CO_3 -Puffer, pH 9,0 gelöst, im Heizexsikkator bei 60° C über P_2O_5 /NaOH eingetrocknet und dann mit 15 μ l Wasser und 15 μ l Dansylchloridlösung versetzt. Nachdem die Reaktion nach 2 - 3 Stunden bei Zimmertemperatur im Dunkeln beendet war, wurde die Lösung unter Vakuum im Heizexsikkator bei 60° C eingetrocknet und danach mit 100 μ l 6 N HCl versetzt. Die Hydrolyse erfolgte bei 110° C unter Stickstoffatmosphäre in 4 Stunden.

Die Salzsäure wurde in einem Vakuumrotationsverdampfer entfernt, und der Rückstand zweimal mit 20 μ l wassergesättigtem Äthylacetat extrahiert. Der getrocknete Extrakt wurde in einem Tropfen 50 %igem Pyrimidin aufgenommen und mit einer feinen Kapillare zur Chromatographie in einer Ecke des Polyamidplättchens aufgetragen. Zuerst wurde in Laufmittel I getrennt, bis die Front den oberen Rand erreicht hatte, dann in Laufmittel II, wobei das Dünnschichtplättchen um 90° gedreht wurde. 2 Minuten nachdem die Front den oberen Rand erreicht hatte, wurde der Lauf beendet.

Bei einer möglichen Anwesenheit von Alanin und zur Unterscheidung zwischen Asp und Glu oder Thre und Ser wurde anstelle von Laufmittel II Laufmittel III verwendet.

15) a) Proteinbestimmung

Lit.: LOWRY, ROSEBROUGH, FARR und RANDALL (1951)

Proteinstandard: Rinderserumalbumin, 98 %ig,
krist. (Serva, Heidelberg);
50 mg in 100 ml Probenlösung

Lösungen:

- A) 1,34 g NaK Tartrat x 4 H₂O in 50 ml Wasser
B) 0,5 g CuSO₄ x 5 H₂O in 50 ml Wasser
C) 4,0 g Na₂CO₃ in 200 ml 0,1 N NaOH
D) Wird vor Verwendung aus 1 Teil A, 1 Teil B
und 100 Teilen C frisch angesetzt
E) Folinreagens: 1 Teil Phenolreagens nach
Folin-Ciocalteu und 1 Teil Wasser

Um eine Verfälschung der Bestimmung durch Tris oder andere störende niedermolekulare Substanzen zu vermeiden wurden die Proteine mit 10 % TCE gefällt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und Reste der Trichloressigsäure sorgfältig von der Wand des Zentrifugenglases entfernt. Die Sedimente wurden in je 2,4 ml der Lösung D gelöst. Nach 10 min wurden 0,2 ml Folinreagens (E) zugegeben und nach 30 min wurde bei 750 nm gemessen.

Zur Aufstellung einer Eichkurve (10 - 150 µg) wurde Rinderserumalbumin in Proben-Puffer gelöst und ebenfalls mit TCE ausgefällt.

15) b) RNS-Bestimmung durch Messung der Extinktion bei 260 nm

Lit.: FLECK und MUNRO (1962)

Lösungen:

PCS konz. (70 %ig)

PCS verd.: 2,1 N; 1,0 N; 0,7 N; 0,5 N; 0,25 N

0,3 N KOH

Durchführung der Bestimmung:

Zu 5 ml Zellkernsuspension wurden 2,5 ml kalte 2,1 N PCS zugegeben. Das Gemisch blieb 15 min in Eis stehen und wurde dann in der Christ-Zentrifuge mit 4500 UpM zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit je 5.0 ml 0,7 N PCS gewaschen.

Anschließend wurden 4.0 ml der 0,3 N KOH zugegeben. Das Gemisch wurde nach Homogenisieren in einem Dounce-Homogenisator für 60 min bei 37° C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben in Eis gestellt, und es wurden 0,125 ml konz. PCS zugegeben. Danach wurde mit 4,2 ml 1.0 N PCS weiterverdünnt. Der Rückstand wurde in der Christ-Zentrifuge sedimentiert und zweimal mit 2,0 ml 0,5 N PCS gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und mit dest. Wasser in einem Meßkolben auf 25 ml aufgefüllt. Endkonzentration der PCS ist 0,25 N.

Der Extrakt wurde (eventuell nach weiterer Verdünnung mit 0,25 N PCS) gegen 0,25 N PCS bei 260 nm gemessen. $E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 213$

15) c) DNS-Bestimmung

Lit.: BURTON (1956)

DNS-Standard: 0,4 mg DNS/ml 5 mM NaOH

Gebrauchsstandard: 1 Vol DNS-Standard + 1 Vol
1 N PCS

Lösungen:

12 N PCS, 0,5 N PCS

Diphenylamin-Reagens:

1,5 g Diphenylamin werden in 100 ml Eisessig gelöst. Dazu werden 1,5 ml konz. Schwefelsäure gegeben. Das Reagens wird im Dunkeln aufbewahrt. Vor Gebrauch werden 0,1 ml einer wässrigen Acetaldehyd-Lösung (16 mg/ml) zu 20 ml Reagens zugegeben. Diese Lösung ist etwa 12 h haltbar.

Vorbereitung der DNS-haltigen Probe:

Die Probe (Homogenat oder Zellkernsuspension) wird mit 12 N PCS bis zu einer Endkonzentration von 0,25 N angesäuert und 30 min in Eis gestellt. Das Präzipitat wird abzentrifugiert und mit 0,5 ml 0,5 N PCS resuspendiert. Es werden weitere 3,5 ml 0,5 N PCS zugegeben und die Suspension 15 min lang auf 70° C erhitzt; dabei wird gelegentlich geschüttelt. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgossen und aufbewahrt. Das Sediment wird nochmals mit 3,0 ml 0,5 N PCS extrahiert. Die beiden Extrakte werden gemischt und ihr Volumen bestimmt.

Durchführung der Bestimmung:

Der DNS-Extrakt wird falls nötig verdünnt. 1 oder 2 ml der DNS-haltigen Probe werden mit 2 Vol des Diphenylamin-Reagens versetzt, ebenso eine DNS-Standardprobe und eine Blindprobe mit 0,5 N PCS. Die Farbe wird während 16 - 20 Stunden (über Nacht) entwickelt. Die Extinktion wird bei 600 nm gemessen.

16) Elektronenmikroskopie

Lit.: REIMER (1967)

Chemikalien:

Glutaraldehyd

Osmiumtetroxid, 1 %ig in Wasser

Uranylacetat, 2 %ig in Wasser

Bleicitrat nach Reynolds, rein (Serva, Heidelberg)

Propylenoxid

Epon (Serva, Heidelberg)

aufsteigende Alkoholreihe

Ultramikrotom Typ Ultratome 4802 A (LKB, Bromma,
Schweden)

Die Zellkerne wurden 10 min bei 700 x g abzentrifugiert, und das Sediment 2 h in 4 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurde, um den Glutaraldehyd zu entfernen, mehrmals mit 0,32 M Saccharoselösung gewaschen. Nach der einstündigen Nachfixierung mit Osmiumtetroxid wurden die Proben in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Nach Zwischenstufen in Propylenoxid bzw. Propylenoxid-Epon (1 : 1) wurden die Präparate dann in reinem Epon für 40 h bei 60° C polymerisiert. Die Eponblöcke wurden mit einem Ultramikrotom geschnitten, und die Schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds doppeltkontrastiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden im Elektronenmikroskop JEM-T7 (Jeol, Tokio) gemacht.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus gereinigten Zellkernen der Rattenleber wurde mit gepufferten isotonischen Salzlösungen, pH 8.0, ein dRNP-Partikel-Rohextrakt gewonnen, aus dem in einem Zweistufenverfahren die 30 S-Partikelfraktionen isoliert wurden.

Wie die Diskelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat zeigte, enthielten die 30 S-Partikel mehrere in ihrem Molekulargewicht klar zu unterscheidende Proteinkomponenten.

Von den Komponenten mit offensichtlich hohem Molekulargewicht, wie sie nach der Trennung des Gesamtproteins der dRNP-Partikel in der SDS-Diskelektrophorese gefunden wurden, konnte gezeigt werden, daß sie zumindest zum Teil als Artefakte anzusehen sind, die sich in vitro ausbilden.

Von den als echt befundenen Proteinkomponenten mit Molekulargewicht 42000, 32000 und 25000 konnten zwei in gereinigter Form isoliert werden: Mit Harnstoff das Protein mit 42000, ohne Harnstoff mit 25000.

Durch trägerfreie Elektrophorese konnte das mit Harnstoff lösliche Hauptprotein mit 42000 ("Informosomenprotein") in hochgereinigter Form erhalten werden. Es erwies sich in der Diskelektrophorese bei pH 4,5 und in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat und in Bezug auf die N-terminale Aminosäure als einheitlich. Die isoelektrische Fokussierung, bei der 5 - 6 isoelektrische Punkte im Bereich von pH 6,9 - 7,8 gefunden wurden, zeigte jedoch eine Mikroheterogenität innerhalb dieser Komponente auf.

Beim Vergleich der mit Harnstoff löslichen Hauptproteinkomponente der 30 S-Partikel aus den Zellkernen anderer Gewebe und Spezies mit dem Hauptprotein aus Rattenleber, das sich durch seinen hohen Glycingehalt (26 Mol %) auszeichnet, konnte eine weitgehende Übereinstimmung der Eigenschaften dieser Proteine festgestellt werden und damit das Vorkommen eines sogenannten Hauptproteins in den 30 S-Partikeln bestätigt werden.

Durch Behandlung mit Lösungen hoher Ionenstärken (0,4 M KCl) konnte von den 30 S-Partikeln ein Teil der Proteine abgelöst werden. Die in diesem Fall hauptsächlich vorliegende Komponente mit 25000 konnte durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert werden und unterscheidet sich außer im Molekulargewicht durch ihre Löslichkeitseigenschaften vom Hauptprotein mit 42000, während die Aminosäurezusammensetzung dieser beiden Proteine weitgehend übereinstimmt. Das mit dem Verfahren der Dissoziation durch hohe Ionenstärke isolierte Protein mit 25000, erwies sich als hoch aktiv durch seine Affinität zu RNS, im Test markierter RNS (dRNS) aus Kernen.

In den 30 S-dRNP-Partikel-Präparationen waren geringe Mengen eines DNAase-empfindlichen chromatinähnlichen Materials anwesend, das ebenfalls durch 0,4 M KCl von den 30 S-Partikeln gelöst wurde und mit etwa 20 S sedimentiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- Awdeh, Z. L.,
Science Tools, The LKB Instrument Journal 16, 42 (1969)
- Behrens, M.,
Z. Physiol. Chem. 209, 59 (1932)
- Billings und Martin,
J. Cell Biol. 59 (2) A 24 (1973)
- Bray, J. A.,
Anal. Biochem. (New York) 1, 279 (1960)
- Britten, R. J. und Kohne, d. E.,
Science 161, 529 (1968)
- Burny, A., Huez, G., Marbaix, G. und Chantrenne, H.,
Biochim. Biophys. Acta 190, 228 (1969)
- Burton, K.,
Biochem. J. 62, 315 (1956)
- Cartouzou, G., Poirée, J. C. und Lissitzky, S.,
Europ. J. Biochem. 8, 357 (1969)
- Chauveau, J., Moulé, S. und Rouiller, C.,
Exp. Cell Res. 11, 317 (1956)
- Congote, L. F., Sekeris, C. E. und Karlson, P.,
Z. Naturforsch. 25 b, 279 (1970)
- Dunker, A. K. und Rueckert, R. R.,
J. Biol. Chem. 244, 5074 (1969)
- Emanuel, C. F. und Chaikoff, I. L.,
Biochim. Biophys. Acta 24, 254 (1957)
- Faiferman, I., Hamilton, M. G. und Pogo, A. O.,
Biochim. Biophys. Acta 204, 550 (1970)
- Faiferman, I., Hamilton, M. G. und Pogo, A. O.,
Biochim. Biophys. Acta 232, 685 (1971)
- Fischer, H. W. und Harris, H.,
Proc. Roy. Soc., London, Series B 156, 521 (1962)
- Fleck, A. und Munro, H. N.,
Biochim. Biophys. Acta 55, 577 (1962)

- Gallinaro-Matringe, H. und Jacob, M.,
FEBS Letters 36, 105, (1973)
- Geesteland, R. F. und Staehelin, T.,
J. Mol. Biol. 24, 149 (1967)
- Girard, M. und Baltimore, D.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 999 (1966)
- Gray, W. R. und Hartley, B. S.,
Biochem. J. 89, 379 (1963)
- Hannig, K.,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 338, 211 (1964)
- Hayes, M. B. und Wellner, D.,
J. Biol. Chem. 244, 6636 (1969)
- Henshaw, E. C.,
J. Mol. Biol., 36, 401 (1968)
- Henshaw, E. C. und Loebenstein, J.,
Biochim. Biophys. Acta, 199, 405 (1971)
- Hogeboom, G. H., Schneider, W. C., und Palade, G. E.,
J. Bio. Chem., 172, 619 (1948)
- Huez, G., Burny, A., Marbaix, G. und Lebleu, B.,
Biochim. Biophys. Acta. 145, 629 (1967)
- Infante, A. A. und Nemer, M.,
J. Mol. Bio. 32, 543 (1963)
- Ishikawa, K., Kuroda, C., und Ogata, K.,
Biochim. Biophys. Acta 179, 316 (1969)
- Ishikawa, K., Kuroda, C. und Ogata, K.,
Biochim. Biophys. Acta 213, 505 (1970)
- Krichevskaya, A. A. und Georgiev, G. P.,
Biochim. Biophys. Acta 194, 619 (1969)
- Kuntz, G.,
Dissertation (1972) Universität München
- Lebleu, B., Marbaix, G., Huez, G., Temmerman, J.,
Burny, A. und Chantrenne, H.,
Europ. J. Biochem. 19, 264 (1971)

- Leboy, P. S., Cox, E. C. und Flaks, G.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 52, 619 (1964)
- Lesnaw, J. A. und Reichmann, M. E.,
Virology, 42, 724 (1970)
- Lowry, O. H. Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und
Randall, R. J.,
J. Bio. Chem. 193, 265 (1951)
- Lukanidin, E. M., Georgiev, G. P. und Williamson, R.,
FEBS Letters 19, 152 (1971)
- Marushige, K. und Bonner, J.,
J. Molek. Biol. 15, 160 (1966)
- Matringe, H. und Jacob, M.,
Biochimie 54, 1169 (1972)
- Moore, S., Spackman, D. H. und Stein, W. H.,
Anal. Chem. 30, 1185 (1958)
- Moulé, Y. und Chauveau, J.,
J. Mol. Biol. 33, 365 (1968)
- Niessing, J. und Sekeris, C. E.,
Biochim. Biophys. Acta 209, 484 (1970)
- Niessing, J. und Sekeris, C. E.,
FEBS Letters 18, 39 (1971)
- Niessing, J. und Sekeris, C. E.,
Biochim. Biophys. Acta 247, 391 (1971)
- Niessing, J. und Sekeris, C. E.,
FEBS Letters 22, 83 (1972)
- Neuhoff, W., von der Haar, F., Schlimme, E. und Weise, M.,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 121 (1969)
- Neuhoff, V., Weise, M. und Sternbach, H.,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1395 (1970)
- Olsnes, S.,
Europ. J. Biochem. 15, 464 (1970)
- Olsnes, S.,
Europ. J. Biochem. 23, 557 (1971)

- Ornstein, L.,
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321 (1964)
- Ovchinnikov, L. P. und Avanesov, A. C.,
Molekul. Biol. (USSR) 3, 893 (1969)
- Panyim, S. und Chalkley, R.,
Arch. Biol. Biophys. 130, 337 (1969)
- Parsons, J. T. und McCarty, K. S.,
J. Biol. Chem. 243, 5377 (1968)
- Perry, R. P. und Kelly, D. E.,
J. Mol. Biol. 35, 37 (1968)
- Peterman, M. L.,
The Physical and Chemical Properties of Ribosomes. (1964)
New York: Elsevier
- Phillips, D. M. P. und Johns, E. W.,
Biochem. J. 94, 127 (1965)
- Philpot, J. St. L. und Stanier, J. E.,
Biochem. J. 63, 214 (1956)
- Platz, R. D., Kish, V. M. und Kleinshmith, L. J.,
FEBS Letters 12, 38 (1970)
- Pogo, A. O., Allfrey, V. G. und Mirsky, A. E.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 550 (1966)
- Potter, V. R. und Elevation, C. A.,
J. Biol. Chem. 114, 495 (1936)
- Quirin-Stricker, C. und Mandel, P.,
FEBS Letters 2, 230 (1969)
- Reiser, L.,
Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und
Präparationsmethoden, Springer, Berlin, 1967
- Righetti, P. und Drysdale, J. W.,
Biochim. Biophys. Acta 236, 17 (1971)
- Samarina, O. F., Krichevskaya, A. A. und Georgiev, G. P.,
Mol. Biol. 13, 131 (1966)

- Samarina, O. P., Krichevskaya, A. A., Molnar, J.,
Bruskov, V. I. und Georgiev, G. P.,
Molekul. Biol. (USSR) 1, 129 (1967)
- Samarina, O. P. Lukanidin, E. M., Molnar, J. und
Georgiev, G. P.,
J. Mol. Biol. 33, 251 (1968)
- Samec, J., Jacob, M. und Mandel, P.,
Biochim. Biophys. Acta 161, 377 (1968)
- Sarasin, A.,
FEBS Letters 4, 327 (1969)
- Sarkar, S.,
Z. Naturforschung 21b, 1202 (1967)
- Scherrer, K. und Marcaud, L.
I. Cell Physiol. 72, 181 (1968)
- Schneider, R. M. und Peterman, M. L.,
Cancer Research 10, 751 (1950)
- Schweiger, A. und Hannig, K.,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 943 (1968)
- Schweiger, A. und Hannig, K.,
Biochim. Biophys. Acta 204, 317 (1970)
- Schweiger, A. und Hannig, K.,
Biochim. Biophys. Acta 254, 255 (1971)
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. und Maizel, J. V.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815 (1967)
- Spirin, A. S., Belitsina, N. V. und Ajtkhozhin, M. A.,
Zhurnal Obschei BioLogii (USSR), 25, 321 (1964)
Englische Übersetzung: Fed. Proc. 24, T 907 (1965)
- Spirin, A. S. und Nemer, M.,
Science 150, 214 (1965)
- Spirin, A. S.,
Europ. J. Biochem. 10, 20 (1969)
- Stoneburg, C. A.,
J. Biol. Chem. 129, 189 (1939)

- Spohr, G., Granboulan, N., Morel, C. und Scherrer, K.,
Europ. J. Biochem., 17, 296 (1970)
- Sugano, H., Suda, S., Kawada, T., und Sugano, I.,
Biochim. Biophys. Acta, 238, 139 (1971)
- Swank, R. T. und Munkres, K. D.,
Anal. Biochem. 39, 462 (1971)
- Ui, N.,
Biochem. Biophys. Acta 229, 567 (1971)
- Vesterberg, O. und Svenson, A.,
Acta Chem. Scand. 20, 820 (1966)
- Weber, K. und Osborn, M.,
J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)
- Yphantis, D. A.,
Ann. N. Y. Acad. Sci. 88, 586 (1960)
- Zaides, V. M., Zaslavsky, V. G., Kaverin, N. V.,
Bukrinskaya, A. G. und Volkova, M. Ya.,
Molekul. Biol. (USSR) 4, 607 (1970)
- Zaslavsky, V. G., Zaides, V. M., Volkova, M. Ya.,
Kaverin, N. V. und Bukrinskaya, A. G.,
FEBS Letters 14, 133 (1971)

Lebenslauf

Am 18. Juni 1941 wurde ich in Ellwangen (Jagst) als zweites von drei Kindern des Majors Werner Schmidt (†) und seiner Ehefrau Irene, geb. Ebert, geboren.

Von 1948 - 1952 besuchte ich die Volksschule in Ellwangen und war anschließend Schüler des Ellwanger Peutinger-Gymnasiums, das ich 1964 mit dem Abitur verließ.

Im Sommer 1964 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Studium der Zahnmedizin. Nach zwei Semestern wechselte ich zum Studium der Biologie über.

Im Oktober 1969 legte ich die mündliche Diplom-Hauptprüfung für Biologie ab und begann Anfang 1970 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Kurt Hannig mit der vorliegenden Doktorarbeit.

